

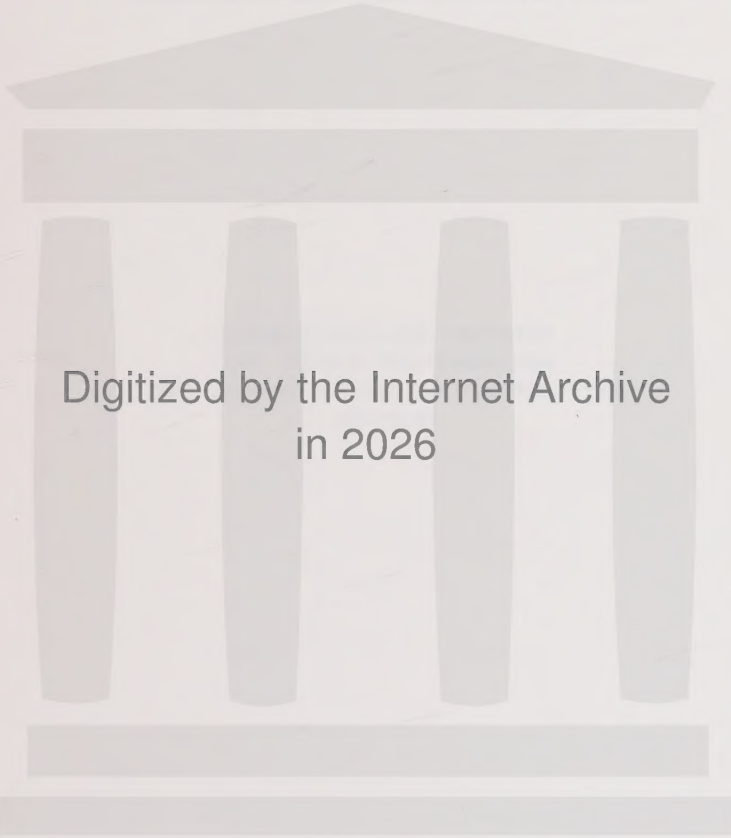
**MOLEKULARE KLONIERUNG VON $C\bar{1}$ - INHIBITOR
DES
MENSCHLICHEN KOMPLEMENTSYSTEMS**

GÜNTHER RAUTH

1987

Disbui. München





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0060

MOLEKULARE KLONIERUNG VON C1-INHIBITOR
DES
MENSCHLICHEN KOMPLEMENTSYSTEMS

DISSERTATION DER FAKULTÄT
FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

vorgelegt von
Günther Rauth
März 1987

1. Berichterstatter: PD Dr. W. Müller-Esterl
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 1987

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 1.1.83 - 30.10.86 an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz) angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Prof. Dr. H. Fritz.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für die Betreuung seitens der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Werner Müller-Esterl für die engagierte Betreuung der Arbeit und für anregende Diskussionen.

Bei den Herren Dr. P. Buckel und Dr. G. Schumacher der Firma Boehringer/Tutzing bedanke ich mich für vielfältige Hilfeleistungen, insbesondere für die Bereitstellung synthetischer Oligonukleotide.

Bei den Herren Prof. Dr. W. Machleidt und J. Kellermann bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung der Proteinsequenz-Daten.

Den Herren Hans Hock und Rudolf Vogel sowie allen übrigen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken.

INHALTSVERZEICHNIS

A.	ZUSAMMENFASSUNG	1
B.	EINLEITUNG	3
B. 1.	Proteolytische Systeme	3
B. 2.	Proteinasen-Inhibitoren	3
B. 3.	Molekulare Parameter von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor	4
B. 4.	Hemmspektrum von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor	6
B. 5.	Physiologische Bedeutung von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor	6
B. 6.	Defizienzen von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor	8
B. 7.	Aufgabenstellung und Ziele	8
C.	MATERIAL UND METHODEN	10
C. 1.	Material	10
C. 1.1.	Geräte	10
C. 1.2.	Substanzen und Materialien	11
C. 2.	Methoden	14
C. 2.1.	Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gradienten-Gel	14
C. 2.2.	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	14
C. 2.3.	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose im elektrischen Feld	15
C. 2.4.	Immunoprint	16
C. 2.5.	Konstruktion einer cDNA-Bibliothek in $\lambda\text{gt}11$	16
C. 2.6.	Amplifizieren einer Genbibliothek	17
C. 2.7.	Immunologische Testung der cDNA-Bibliothek	18
C. 2.8.	Subklonierung von Phagen-Populationen	21
C. 2.9.	Herstellung von Phagen-Stammlösungen mit hohem Titer	21
C. 2.10.	Gewinnung von Phagen-DNA nach der Platten-Lysat-Methode	22
C. 2.11.	Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen	23
C. 2.12.	Elektrophorese in Agarose-Gelen	23
C. 2.13.	Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen	24
C. 2.14.	Umklonierung von DNA in den Phagen M13	24
C. 2.14.1.	Spaltung von M13 mit Restriktionsenzymen	26
C. 2.14.2.	Ligierung von M13 mit Fremd-DNA	26
C. 2.14.3.	Transformation kompetenter Bakterienzellen mit rekombinanten M13-Phagen	26

C. 2.15.	Isolierung von rekombinanter Einzelstrang-DNA des Phagen M13	29
C. 2.16.	Sequenzierung von DNA nach der Didesoxy-Terminations-Methode	29
C. 2.17.	Elektrophorese im keilförmigen Polyacrylamid/Harnstoff-Gel	31
C. 2.18.	Autoradiographie der Sequenz-Gele	31
C. 2.19.	Gewinnung von rekombinantem Antigen aus lyso-genen Zellen	32
C. 2.20.	BrCN-Spaltung von C $\bar{I}$ -Inhibitor	33
C. 2.21.	Isolierung von Fragmenten aus der BrCN-Spaltung mittels FPLC	34
C. 2.22.	Inkubation von C $\bar{I}$ -Inhibitor-Fragmenten mit Endo-glykosidase F	34
D.	ERGEBNISSE	35
D. 1.	Amplifizieren einer λ gt11 cDNA-Bibliothek	35
D. 2.	Immunologische Testung einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek in λ gt11	35
D. 2.1.	Durchmusterung der cDNA-Bibliothek mit spezifi-schen Antikörpern gegen C $\bar{I}$ -Inhibitor	35
D. 2.2.	Subklonieren von Phagen-Populationen	35
D. 3.	Immunologische Testung C $\bar{I}$ -Inhibitor-spezifischer Klone mit monoklonalen Antikörpern gegen C $\bar{I}$ -Inhibitor	36
D. 4.	Herstellung von Phagen-Stammlösungen mit hohem Titer	38
D. 5.	Isolierung von Phagen-DNA und Bestimmung der Größe der cDNA-Insertionen	38
D. 6.	Präparative Darstellung der cDNA-Insertion von Klon C1I-12	40
D. 6.1.	Restriktionsverdauung von C1I-12 DNA mit Eco RI	40
D. 6.2.	Isolierung der cDNA-Insertionen von C1I-12 aus einem präparativen Agarosegel	41
D. 7.	Subklonierung von C $\bar{I}$ -Inhibitor-spezifischen cDNA-Fragmenten in den Phagen M13 mp10	42
D. 7.1.	Spaltung von M13 mp10 mit Eco RI	42
D. 7.2.	Ligierung von Vektor M13 mp10 mit C $\bar{I}$ -Inhibitor-spezifischen cDNA Fragmenten	43
D. 7.3.	Transformation kompetenter Zellen mit rekombi-nanter M13 mp10-DNA	43

D. 7.4.	Isolierung von rekombinanter Einzelstrang-DNA des Phagen M13 mp10	44
D. 8.	Sequenzierung von $C\bar{I}$ -Inhibitor-spezifischen cDNA-Insertionen nach der Didesoxy-Terminations-Methode	45
D. 8.1.	Ermittlung der Orientierung der cDNA-Insertionen in M13	45
D. 8.2.	Sequenzierung der beiden Stränge des 1.2 kBp bzw. 0.6 kBp Fragments von C1I-12	47
D. 9.	Isolierung und Charakterisierung von rekombinantem β -Galaktosidase/ $C\bar{I}$ -Inhibitor-Fusionsprotein .	55
D. 9.1.	Selektion von lysogenen Bakterienzellen	55
D. 9.2.	Präparation von Lysaten aus lysogenen Y 1089 Zellen	56
D. 10.	Nachweis des hochglykosylierten Bereichs in $C\bar{I}$ -Inhibitor	58
D. 10.1.	BrCN-Spaltung von $C\bar{I}$ -Inhibitor	58
D. 10.2.	Isolierung der BrCN-Fragmente mittels FPLC	59
D. 10.3.	Enzymatische Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratreste durch Endoglykosidase F	60
E.	DISKUSSION	63
E. 1.	Isolierung von $C\bar{I}$ -Inhibitor-spezifischer cDNA ..	63
E. 2.	Sequenzierung der cDNA von $C\bar{I}$ -Inhibitor	65
E. 3.	Proteinchemische Daten von $C\bar{I}$ -Inhibitor	69
E. 4.	Homologieuntersuchungen mit anderen Proteinen ...	72
E. 5.	Ausblick	76
F.	LITERATURVERZEICHNIS	77
G.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
	LEBENS LAUF	85



A. ZUSAMMENFASSUNG

1. Humaner $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor der Serinproteinasen $\text{C}\bar{\text{I}}\text{r}$, $\text{C}\bar{\text{I}}\text{s}$ und Plasmakallikrein, die als Initiationsfaktoren bei Komplementaktivierung und Blutgerinnung von entscheidender Bedeutung sind. Zur Aufklärung der molekularen Struktur des Inhibitors wurde seine zugrundeliegende cDNA kloniert, sequenziert und daraus die Aminosäuresequenz vorhergesagt. Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek, die aus humaner Leber-mRNA im Phagen $\lambda\text{gt}11$ konstruiert worden war, mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen menschlichen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor gesichtet und 107 positive Plaques bei einer Gesamtzahl von 2×10^5 Rekombinanten gefunden.
2. Aus der Gesamtheit der positiven Plaques wurden 12 willkürlich ausgewählt und bis zur Klonalität gereinigt ($\text{C}\bar{\text{I}}\text{I}-1$ bis $\text{C}\bar{\text{I}}\text{I}-12$). Die Restriktionsverdauung der isolierten Phagen-DNA ergab, daß Klon $\text{C}\bar{\text{I}}\text{I}-12$ mit 1.8 kBp die längste Fremd-DNA enthielt. Diese Insertion wies eine interne Eco RI-Schnittstelle auf, so daß durch präparative Agarose-Gelelektrophorese zwei Fragmente von 0.6 kBp bzw. 1.2 kBp isoliert werden konnten (Ausbeute ca. 80 %).
3. Zur Sequenzierung wurden die beiden Fragmente in den Phagen M13 mp10 umklont und die entsprechende Einzelstrang-DNA isoliert. Bei der Sequenzierung nach der Didesoxy-Terminations-Methode wurden synthetische Oligonukleotide (20mere) als spezifische Primer eingesetzt, die anhand der ermittelten Sequenzdaten sukzessive hergestellt wurden ("specific primer-directed sequencing"). Mit diesem Verfahren konnte die vollständige Sequenz der cDNA-Insertion von $\text{C}\bar{\text{I}}\text{I}-12$ aufgeklärt werden.
4. Die cDNA-Insertion von Klon $\text{C}\bar{\text{I}}\text{I}-12$ war 1777 Bp lang; davon kodierten die 1497 Basen des 5'- terminalen Bereichs für die biosynthetische Vorstufe des $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitors einschließlich eines Signalpeptids. Ein untranslatierter Bereich am 5'- Ende der Insertion wurde nicht gefunden; hingegen enthielt die 3'-terminale Region einen untranslatierten Bereich von 280 Basen; 15 Basen stromaufwärts des Poly(A)_n-Schwanzes ($n=12$) wurde ein typisches Polyadenylierungssignal (AATAAA) gefunden.
5. Die aufgrund der cDNA-Sequenz vorhergesagte Aminosäuresequenz zeigt, daß der menschliche $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor als Prä-Inhibitor von (mindestens) 499 Aminosäuren synthetisiert wird. Am N-terminalen Ende findet sich ein für sekretorische Proteine typischer hydrophober Bereich; eine charakteristische Spaltstelle für die Signalpeptidase wurde zwischen den Positionen 21/22

- gefunden, so daß das vorhergesagte Signalpeptid mindestens 21 Aminosäuren lang ist. Ab Position 22 findet sich der bekannte N-Terminus des reifen Proteins; vermutlich enthält C $\bar{1}$ -Inhibitor keinen Pro-Anteil. Der reife Inhibitor besteht aus 478 Aminosäuren; die N-terminale Aminosäure ist Arginin, die C-terminale Alanin.
6. Zwischen den Positionen 43 und 98 der Aminosäuresequenz des reifen C $\bar{1}$ -Inhibitors findet sich ein Bereich, in dem das Tetrapeptid Gln-Pro-Thr-Thr und Varianten davon insgesamt 14 mal wiederholt wird. Vermutlich handelt es sich bei dieser Konsensus-Sequenz (Xaa-Yaa-Thr-Thr) um eine Akzeptorsequenz für O-Glykosyltransferasen; diese Hypothese konnte durch Analyse definierter BrCN-Fragmente von C $\bar{1}$ -Inhibitor mit Endoglykosidase F wahrscheinlich gemacht werden. Darüber hinaus weist das Protein insgesamt fünfmal die Sequenz Asn-Xaa-Thr(Ser) auf, die als Akzeptorsequenz für N-glykosidische Kohlehydratseitenketten bekannt ist. Die beiden Aminosäuren im reaktiven Zentrums des C $\bar{1}$ -Inhibitors, Arginin und Threonin, sind im C-terminalen Bereich des Inhibitors in Position 444 und 445 lokalisiert.
7. Die Untersuchung auf Sequenzhomologien von C $\bar{1}$ -Inhibitor mit anderen bekannten Proteinasen-Inhibitoren ergab, daß dieser Inhibitor zur Superfamilie der Serin-Proteinasen-Inhibitoren (Serpine) gehört. Ein Spezifikum von C $\bar{1}$ -Inhibitor ist, daß er neben der Serpin-Domäne (Positionen 99 bis 478 des reifen Proteins) noch eine N-terminale Domäne (Positionen 1 bis 98) besitzt, die hochglykosyliert ist. Die Funktion dieser N-terminalen Domäne ist bislang unbekannt. Somit stellt C $\bar{1}$ -Inhibitor den ersten Vertreter einer neuen Subklasse von Serpinen dar.

B. EINLEITUNG

B. 1. Proteolytische Systeme

Die Steuerung biologischer Prozesse durch Proteinasen ist ein in der Natur weit verbreitetes Prinzip (Neurath & Walsh, 1976). Stammesgeschichtlich betrachtet treten Proteinasen erstmals bei Mikroorganismen wie Viren oder Bakterien auf, wo sie Prozesse wie die posttranslationale Modifizierung von neu synthetisierten Proteinen oder die Regulation des intrazellulären Katabolismus von Proteinen wahrnehmen (Cohen & Holzer, 1979). Auf der Stufe höherer Organismen wie den Vertebraten finden sich komplex aufgebaute proteolytische Systeme, bei denen eine Vielzahl von Proteinasen ihre koordinierte Wirkung meist durch limitierte Proteolyse entfalten (Reich et al., 1975). Derartige proteolytische Kaskadensysteme steuern elementare biologische Vorgänge wie die Blutgerinnung (Davie et al., 1979), die Fibrinolyse (Wiman & Collen, 1978), die Komplementaktivierung (Reid & Porter, 1981) und die Fusion von Gameten bei der Befruchtung (Morton, 1977). Die Kontrolle der Aktivität der beteiligten Proteinasen ist von entscheidender physiologischer Bedeutung und erfolgt prinzipiell nach zwei Mechanismen: einerseits können inaktive Vorstufen von Enzymen durch limitierte Proteolyse aktiviert werden; andererseits werden die aktivierten Proteinasen von spezifischen Inhibitoren durch Komplexbildung gehemmt.

B. 2. Proteinase-Inhibitoren

Proteinase-Inhibitoren auf Proteinbasis sind in der Natur weit verbreitet. So findet man sie nicht nur in Geweben und Körperflüssigkeiten von Tieren, sondern auch in Pflanzen und Mikroorganismen (Laskowsky & Kato, 1980). Nach ihren Zielenzymen teilt man die Inhibitoren in vier Klassen ein: die Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteinase-Inhibitoren. Bis auf wenige Ausnahmen reagieren die Inhibitoren streng klassenspezifisch.

Eine besondere Rolle kommt den Proteinase-Inhibitoren des menschlichen Plasmas zu, die nach Albumin und den Immunglobulinen die drittgrößte Gruppe von Plasmaproteinen darstellen. Bis auf α_2 -Makroglobulin und die Cystein-Proteinase-Inhibitoren gehören alle bisher bekannten Inhibitoren des Plasmas zur Klasse der Serin-Proteinase-Inhibitoren ("Serpine", Carrell & Travis, 1985). Zu ihren Zielenzymen gehören Proteinasen wie Thrombin, Plasmin und Plasminogenaktivator (Travis & Salvesen, 1982). Ein prominenter Vertreter der Serpine ist der C $\bar{1}$ -Inhibitor (Syno-

nyme: $\overline{\text{C1}}$ -Inaktivator, $\overline{\text{C1}}$ -Esterase-Inhibitor), der einzige bisher bekannte Inhibitor der Komplementfaktoren $\overline{\text{C1r}}$ und $\overline{\text{C1s}}$ (Sim et al., 1979).

B. 3. Molekulare Parameter von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor

$\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor ist ein einkettiges Glykoprotein (35 % Kohlenhydratanteil) mit einem apparenten Molekulargewicht von 104 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 2.7 - 2.8 (Haupt et al., 1970). Seine Plasmakonzentration beträgt ca. 200 mg/l (Harpel., 1976). $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor wird von verschiedenen Organen und Zellen synthetisiert, wie z.B. von der Plazenta (Gitlin & Biasucci, 1969) oder von Monozyten (Bensa et al., 1983). Hauptsyntheseort des Plasma-Proteins scheint aber die Leber zu sein, wie durch Untersuchungen an kultivierten Hep G2-Zellen gezeigt werden konnte (Prandini et al., 1986). Die ersten Daten zur Primärstruktur des $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitors wurden 1983 von Harrison publiziert, der die 40 amino-terminalen Aminosäuren aufklärte (Abb. 1). Als N-Terminus wurde Asparagin bestimmt; in den Positionen 5 - 9 wurden Aminosäurereste mit Hydroxylgruppen gefunden. 1985 konnten von Salvesen et al. 12 Aminosäuren des reaktiven Zentrums, das im C-terminalen Teil des Inhibitors lokalisiert ist, aufgeklärt werden.

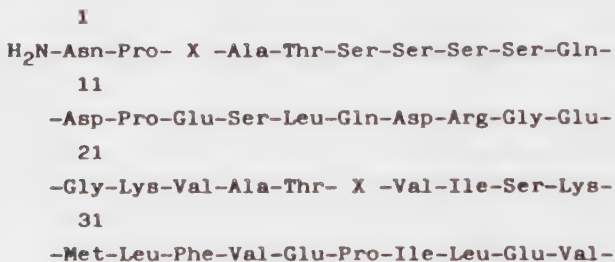


Abb. 1 Amino-terminale Sequenz von menschlichem $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor (Harrison, 1983)

Als Aminosäurereste P_1 bzw. P'_1 (Schechter & Berger, 1967) des reaktiven Zentrums von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor wurden die Aminosäuren Arginin bzw. Threonin bestimmt (Salvesen et al., 1985)(Abb. 2).

Inhibitor	P2 P1 P1' P2' P3' P4'
C1-Inhibitor	-Ala-ARG-Thr-Leu-Leu-Val-
α_1 -Antitrypsin	-Pro-MET-Ser-Ile-Pro-Pro-
Valin-Mutante	-Pro-VAL-Ser-Ile-Pro-Pro-
Pittsburgh-Variante	-Pro-ARG-Ser-Ile-Pro-Pro-
Antithrombin III	-Gly-ARG-Ser-Leu-Asn-Pro-
α_2 -Antichymotrypsin	-Leu-LEU-Ser-Ala-Leu-Val-
Contrapsin (Maus)	-Arg-LYS-Ala-Ile-Leu-Pro-

Abb. 2 Vergleich des reaktiven Zentrums von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor mit dem anderer Serin-Proteinasen-Inhibitoren; die Valin-Mutante und die Pittsburgh-Variante sind α_1 -Antitrypsin-Derivate.

Biosynthetische Vorstufen von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor (Prä- oder Präpro-Inhibitor) konnten bislang nicht isoliert werden. Die detaillierte Raumstruktur von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor ist noch unbekannt; allerdings konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, daß das Molekül aus zwei Domänen aufgebaut ist, mit einem stabartigen Bereich von 33 nm Länge und 2 nm Durchmesser, sowie einem globulären terminalen Bereich mit 4 nm mittlerem Durchmesser (Odermatt et al., 1981).

Entsprechend ihren unterschiedlichen Hemmspezifitäten gibt es zwischen den genannten Inhibitoren keine Homologien im reaktiven Zentrum (siehe Abb. 2). Erstaunlicherweise zeigt aber auch die N-terminale Aminosäuresequenz von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor keinerlei Homologien mit α_1 -Proteinase-Inhibitor, Antithrombin III und α_2 -Antiplasmin, die alle zur Superfamilie der Serpine zählen (Carrell & Travis, 1985) und untereinander signifikante Sequenzhomologien besitzen. Demnach muß $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor zu einer neuen Subklasse von Serpinen gehören, die trotz gleichem Hemm-Mechanismus strukturelle Besonderheiten gegenüber den anderen Serpinen besitzen sollte.

B. 4. Hemmspektrum von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor

$\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor hemmt die Komplementfaktoren $\overline{\text{C1r}}$ und $\overline{\text{C1s}}$ (Harpel & Cooper, 1975), aber auch Plasmakallikrein, Plasmin und die Blutgerinnungsfaktoren XIa und XIIa (Ratnoff et al., 1969; Forbes et al., 1970). Der Hemmechanismus für $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor ist im Detail aufgeklärt worden (Abb. 3). So konnte durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese gezeigt werden, daß $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor mit seinen Zielenzymen stabile Komplexe der Stöchiometrie 1 : 1 bildet (Pixley et al., 1985; van der Graaf et al., 1983). Die Komplexbildung geht mit einer proteolytischen Modifizierung des Inhibitors unter Freisetzung eines kleinen Peptids einher (Weiss & Engel, 1983). Die Proteinase- $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor-Komplexe können durch Nukleophile wie Hydroxylamin oder Ammoniak dissoziiert werden (Chesne et al., 1982; Nilson et al., 1983); ein ähnliches Reaktionsschema gilt für andere Serin-Proteinase-Inhibitoren des Plasmas, wie α_1 -Antitrypsin, Antithrombin III und α_2 -Antiplasmin.

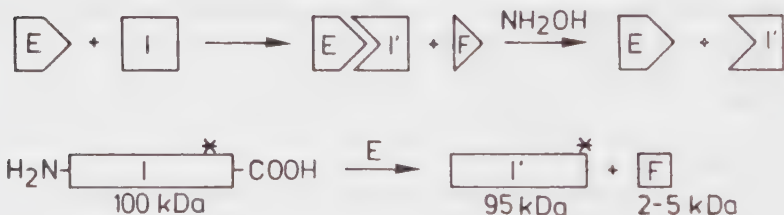


Abb. 3 Hemmechanismus von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor

I: Inhibitor; I': modifizierter Inhibitor; E: Enzym;
F: freigesetztes C-terminales Fragment des Inhibitors ("post-complex peptide")

B. 5. Physiologische Bedeutung von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor

Die physiologische Bedeutung von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor liegt sowohl in der Inhibierung der "frühen" Komponenten der klassischen Komplementaktivierung, als auch in der Kontrolle von Serin-Proteinasen, die an der Initiation der endogenen Blutgerinnungskaskade im Rahmen der Kontaktphasenaktivierung beteiligt sind, wie z.B. Faktor XIIa (Hageman-Faktor) und Plasmakallikrein (Abb. 4).

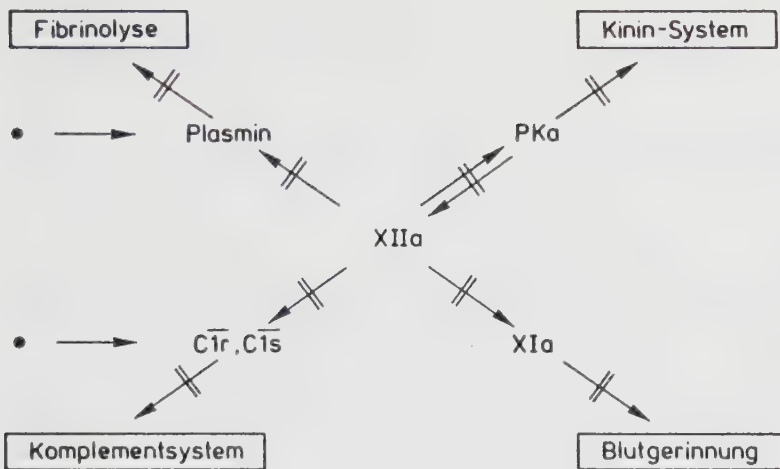


Abb. 4 Angriffspunkte von $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor im Komplementsystem, in der Blutgerinnungskaskade, im Kinin-System und in der Fibrinolyse

*: physiologische Aktivierungswege

—||—: Blockierung der Funktion von Proteinasen durch Hemmung mit $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor

PKa: Plasmakallikrein; XIa bzw. XIIa: Blutgerinnungsfaktor XIa bzw. XIIa; $\text{C}\bar{1}\text{r}/\text{C}\bar{1}\text{s}$: Aktive Komponenten der $\text{C}\bar{1}$ -Esterase des Komplementsystems

Kinetische Untersuchungen zeigten, daß $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor 90 % des Faktors XIIa bzw. XIIIf im Plasma inaktiviert (Pixley et al., 1985); weiterhin ist $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor in der Lage, unter physiologischen Bedingungen 58 % des aktiven Plasmakallikreins zu inhibieren, während α_2 -Makroglobulin nur mit 38 % zur Inaktivierung beiträgt (Schapira et al., 1982; Harpel et al., 1985). Damit ist $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor der physiologisch wichtigste Hemmstoff für Faktor XIIa, Plasma-Kallikrein, ebenso wie für $\text{C}\bar{1}\text{r}$ und $\text{C}\bar{1}\text{s}$.

B. 6. Defizienzen von $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor

Vom $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor sind kongenitale Defizienzen bekannt, die erstmals 1963 von Donaldson & Evans beschrieben wurden, und die sich im "hereditären angioneurotischen Ödem" (HANE) äußern. Die Patienten leiden unter spontan auftretenden Ödemen im Atemtrakt, an Häuten und Schleimhäuten, und vor allem im Gastrointestinaltrakt (Frank et al., 1976). Während der Großteil der Patienten (80 %), die unter HANE leiden, nahezu keinen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor im Plasma besitzt (HANE Typ I), haben andere Individuen praktisch normale Konzentrationen einer dysfunktionellen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Variante (HANE Typ II) (Rosen et al., 1965). Da sowohl HANE Typ I als auch Typ II autosomal dominant vererbt werden (Cicardi et al., 1982), sollte man erwarten, daß die betroffenen Individuen heterozygot für das $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Gen sind. So sollten Patienten mit HANE Typ I ungefähr 50 % normalen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor und Patienten mit HANE Typ II ungefähr 50 % normalen und 50 % dysfunktionellen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor haben. Dies trifft allerdings nicht zu, denn die Mehrzahl der HANE-Patienten hat einen Plasma-Spiegel an funktionellem $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor von 20 % (Rosen et al., 1971). Der Zusammenhang zwischen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor-Defizienz und dem klinischen Bild des "hereditären angioneurotischen Ödems" ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch scheint das verminderte Hemmpotential sowohl bei der unkontrollierten Aktivierung des Komplementsystems durch $\text{C}\bar{1}\text{r}/\text{C}\bar{1}\text{s}$ als auch bei der Freisetzung des Entzündungsmediators Kinin durch Plasmakallikrein eine wesentliche pathogenetische Rolle zu spielen (Donaldson et al., 1977; Schapira et al., 1983).

B. 7. Aufgabenstellung und Ziele

Angesichts der physiologischen Bedeutung von $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor bei der Regulation von Blutgerinnung und Komplementaktivierung und im Hinblick auf die Sonderstellung von $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor innerhalb der Familie der Serpine war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die komplette Primärstruktur von $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor (inklusive seiner biosynthetischen Vorstufen) mit Hilfe molekularbiologischer Methoden aufzuklären.

Die Strategie zum Erreichen dieses Zieles umfaßte folgende Punkte:

- Testung einer aus menschlicher Leber-mRNA konstruierten cDNA-Bibliothek in $\lambda\text{gt}11$ mit polyklonalen Antikörpern, die spezifisch für humanen $\text{C}\bar{1}$ -Inhibitor sind;

- Subklonierung von Phagen, deren Expressionsprodukte in der Immundetektion positiv erscheinen; Gewinnung von rekombinanter DNA aus diesen Phagen und Analyse der Fremd-DNA-Insertionen nach Verdauung mit Restriktionsenzymen;
- Präparative Darstellung der größten Insertions-DNA und Subklonierung in den Phagen M 13;
- Transformation von Wirtszellen mit rekombinanten M 13 Phagen, Propagierung dieser Phagen und Isolierung der sezernierten Einzelstrang-DNA;
- Sequenzierung der cDNA im Einzelstrang-Phagen M 13 nach der Didesoxy-Terminations-Methode unter Zuhilfenahme synthetischer Oligonukleotide; Ermittlung der kompletten cDNA-Sequenz;
- Vorhersage der Aminosäuresequenz von C1^- -Inhibitor aus der cDNA-Sequenz; Vergleich mit bekannten Aminosäuresequenzdaten; Untersuchung der Homologie mit anderen Serpinen.

C. MATERIAL UND METHODEN

C. 1. Material

C. 1.1. Geräte

-SDS-Elektrophorese

Flachgelelektrophoresekammer (vertikales Gelelektrophorese-System), Nr. 1070, Modell V 161 (Fa. BRL, Neu-Isenburg)
Spannungsgerät, Typ 2197 (Fa. LKB, München)

- Western Blot und Immunoprint

Transblotkammern Transphor mit Spannungsgerät, Typ 2005 bzw. Multiphor II Nova Blot, Typ 2117-005/250 (Fa. LKB, München)

- Agarose-Elektrophorese

Miniphor Elektrophoresekammer, Nr. 2013-001 und Maxiphor Elektrophoresekammer, Nr. 2012-001 (Fa. LKB, München)
Mikrowellenherd, Typ R-6270 (Fa. Sharp, Hamburg)

- DNA-Sequenzierung

Macrophor Sequenzierkammer, Nr. 2010-001; Spannungsgerät Macrodrive 5, Nr. 2297-012; MultiTemp II Thermostat/Kryostat, Nr. 2219-002; Macromould Gelgießstand, Nr. 2010-100 (Fa. LKB, München)

- Mikrobiologische Techniken

Präzisionsbrutschrank, Typ B 5060 E (Fa. Heraeus, Hanau)
Zentrifuge Centrikon H-401 (Fa. Kontron, Eching)
Inkubator, Typ ITH-1 und Tisch-Universal-Schüttler, Typ TU-1 (Fa. B. Braun, Melsungen)
Sterile Arbeitsbank, Typ Uniflow UVUB 1200 Biohazard (Fa. Uni Equip, München)
Laborautoklav, Typ HST 410 (Fa. Dr. Morand, Aclens-Lausanne)
Trockenschrank, Typ UL 30 (Fa. Memmert, Schwabach)
Wasserbad, Typ Exatherm U3 electronic (Fa. Julabo Labortechnik, Seelbach)
Spektralphotometer, Typ Eppendorf (Fa. Netheler & Hinz, Hamburg)

- weitere Geräte

Computer QX 10, Plotter HI-80 (Fa. Epson, Düsseldorf)
Lyophilisations-Zentrifuge (Fa. Savant, New York)
pH-Meter 12 S bzw. 114 D (Fa. Püsl, München)
FPLC-Apparatur, (Fa. Pharmacia, Freiburg)

C. 1.2. Substanzen und Materialien

- SDS-Elektrophorese

Natriumdodecylsulfat (SDS), Nr. 20760 (Fa. Serva, Heidelberg),
Dithiothreitol (DDT), Nr. 161-0611 (Fa. Bio-Rad, München), Coomassie Brilliant Blue R-250, Nr. 35051 (Fa. Serva, Heidelberg)
Markerproteine für SDS-Gele: Myosin (schwere Kette, 200 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase B (92.5 kDa), Rinderse-
rumalbumin (RSA, 66kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (31
kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (21.5 kDa), Lysozym (14 kDa)
Nr. 161-0304/161-0303 (Fa. Bio-Rad, München)

- Western Blot und Immunoprint

Nitrocellulose (0.45 μ m Porengröße), Nr. 401196 (Fa. Schleicher
& Schuell, Dassel)
4-Chlor-1-naphthol, Nr. C8890; Avidin, Nr. A9275; biotinylierte
Peroxidase, Nr. P9272 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
Rinderse-
rumalbumin (RSA), Nr. 735 108 (Fa. Boehringer, Mannheim)

- Agarose-Elektrophorese

Agarose, Typ II, Nr. A-6877 (Fa. Sigma, Deisenhofen)
Agarose (niedrig schmelzende, $T_m=65^{\circ}\text{C}$), Nr. 540-5517 UA (Fa.
Gibco BRL, Eggenstein)
Ethidiumbromid, Nr. 21238 (Fa. Serva, Heidelberg)
 λ -DNA, Nr. 00866-74 (Fa. Pharmacia, Freiburg)
DNA-Marker (X 174/Hae III): 1353 Bp, 1078 Bp, 872 Bp, 603 Bp,
310 Bp, 281 Bp, 271 Bp, 231 Bp, 194 Bp, 118 Bp, 72 Bp;
Nr.56611SA (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

- DNA-Sequenzierung

Acrylamid, Nr. 10675; N, N'-Methylenbisacrylamid, Nr. 29195;
Harnstoff, Nr. 24 524 (Fa. Serva, Heidelberg)
Bromphenolblau, Nr. 1840-901; Xylol Cyanol FF, Nr. 1840-502;
Bind-Silane, Nr. 1850-251; Repel-Silane, Nr. 1850-252; Abstands-
halter und Kämme (0.1 mm, 26 Proben), Nr. 2010-402 (Fa. LKB,
München)
M13 Sequenzierungs-Kit, Nr. 4502; (^{35}S)dATP α S (600 Ci/mmol), Nr.
SJ 304 (Fa. Amersham, Braunschweig)
dATP, Nr. 27-2050; dCTP, Nr. 27-2060; dGTP, Nr. 27-2070; dTTP,
Nr. 27-2080; ddATP, Nr. 27-4819; ddCTP, Nr. 27-4823-01; ddGTP,
Nr. 27-4817; ddTTP, Nr. 27-4831 (Fa. Pharmacia, Freiburg)
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), Nr. 104 523 (Fa. Boehringer,
Mannheim)

Unifix Fixierer, Nr. Cat 351 2001; D19 Entwickler, Nr. Cat 502 7065; X-Omat S Filme, Nr. Cat 501 3131 (Fa. Kodak, Rochester, USA)

- Mikrobiologische Techniken

Petrischalen (Ø 9 cm), Nr. 82/1.192 (Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf)

Nitrozellulose-Membranfilter (Ø 8.2 cm, 0.45 µm Porengröße), Nr. 10401116 (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel)

Bacto-Agar, Nr. 0140-01; Bacto-Trypton, Nr. 0123-01; Hefeextrakt, Nr. 0127-01 (Fa. Difco, Detroit)

Pepton aus Casein C/HSF, Nr. 48614 (Fa. Serva, Heidelberg)

N-Z-Amine A (Casein-Hydrolysat), Nr. 101290 (Fa. ICN, Cleveland, USA)

Maltose, Nr. M-5885; Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Nr. 5502 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal), Nr. 651 745 ; Ampicillin, Nr. 835 242 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Dimethylsulfoxid (DMSO), Nr. 9678 (Fa. Merck, Darmstadt)

Polyethylenglykol (PEG) 6000, Nr. 807 491 (Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)

- weitere Substanzen und Materialien

M 13 Klonierungs-Kit, Nr. 4503 (Fa. Amersham, Braunschweig)

Restriktionsendonukleasen: Hind III, Nr. 27-0860-O; Kpn I, Nr. 27-0908; Sma I, Nr. 27-0942; Hae III, Nr. 37-0866 (Fa. Pharmacia, Freiburg); Eco RI, Nr. 240 974; Rsa I, Nr. 729 124 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Endoglykosidase F (aus *Flavobacterium meningosepticum*), E.C. 3.2.1.96, Nr. 878 740 (Fa. Boehringer, Mannheim)

Alle weiteren Chemikalien wurden von Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma, Deisenhofen in p.a.-Qualität bezogen.

Aqua bidest. wurde über ein Seral Reinstwasser-System gewonnen (Fa. Alhäuser, Ransbach-Baumbach).

Für die DNA-Sequenz Analyse wurde das Computerprogramm MicroGenie^R (Cary Queen & Laurence Korn) der Fa. Beckman, München verwendet.

Für die Homologieuntersuchungen auf Proteinebene wurde das Computerprogramm Fast P von Pearson & Lipman (1985) verwendet.

Freundlicherweise wurden zur Verfügung gestellt:

C $\bar{1}$ -Inhibitor (aus Mensch), anti-C $\bar{1}$ -Inhibitor-Antikörper (aus Kaninchen) und monoklonale Antikörper gegen C $\bar{1}$ -Inhibitor (aus Maus) (H.Hock, Abtlg. f. Klin. Chem., München; siehe Hock, 1987)
E.coli JM 103 (Dr. G. Schumacher, Fa. Boehringer, Tutzing)
 λ gt11 cDNA-Bibliothek aus humaner Leber-mRNA (Dr. S.L.C. Woo, Houston, Texas)

Oligonukleotide (20mere) wurden nach der Phosphoramidit-Methode in einem Biosearch DNA-Synthesizer hergestellt und ohne Nachreinigung für die Sequenzierung verwendet (Dr. P. Buckel, Fa. Boehringer, Tutzing)

C. 2. Methoden

C. 2.1. Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese im Polyacrylamid-Gradienten-Gel (Laemmli, 1970)

Lösungen

Probenpuffer (2X): 4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) Glycerin, 0.25 M Tris-Base, 10 % DTT, ad 10 ml aqua dest., pH 6.8; Anfärbung mit 10 µl gesättigter Bromphenolblau-Lösung

Elektroden-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

Durchführung

Die diskontinuierliche SDS-Elektrophorese erfolgte je nach gewünschtem Trennbereich in unterschiedlichen Polyacrylamid-Gradientengelen (5 - 10 % oder 10 - 20 %). Die zu applizierenden Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentration 1X) und 5 min bei 95°C zur Reduktion der Disulfid-Brücken inkubiert. Die SDS-Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur, zunächst eine halbe Stunde bei 30 mA, anschließend bei 40 mA. Die Proteine auf dem Gel wurden entweder durch Silberfärbung (C. 2.2.) sichtbar gemacht oder mittels Western Blot auf Nitrocellulose transferiert und über das Immunoprint-Verfahren detektiert (C. 2.4.).

C. 2.2. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen (Oakley et al., 1980)

Lösungen

L1: 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.

L2: 5 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure in aqua bidest.

L3: 10 % (v/v) Glutardialdehyd in aqua bidest.

L4: Silbernitrat-Lösung: 2.8 ml 25 % (v/v) Ammoniak-Lsg., 42 ml 0.36 % (w/v) NaOH, 8 ml 19.4 % (w/v) Silbernitrat-Lösung (tropfenweise zugeben), ad 200 ml aqua bidest.

L5: 0.005 % (w/v) Citronensäure, 0.019 % (v/v) Formaldehyd, ad 200 ml aqua bidest.

L6: 5 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel wie folgt behandelt:

Lösung	Volumen (ml)	Zeit (min)
L1	200	30
L2	200	30
L3	200	30
aqua bidest.	je 200	10 (6X)
L4	200	15
aqua bidest	je 200	10 (4X)
L5	200	3 - 10
L6	200	30

Die Silberfärbung wurde für Proteinmengen < 2 µg pro Lauflinie eingesetzt.

C. 2.3. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose im elektrischen Feld (Towbin et al., 1979)

Lösungen

Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 1000 ml (20 % v/v) Methanol, ad 5 l aqua dest., pH 8.3 (4°C)

Durchführung

Unmittelbar nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel luftblasenfrei auf eine in Transfer-Puffer vorgetränkte Nitrocellulose (0.45 µm) gelegt und zwischen 2 x 3 Lagen Whatman-Filterpapier und 2 Lagen Schaumstoff so in die mit Transfer-Puffer gefüllte Western-Blot-Kammer gespannt, daß die Nitrocellulose zur Anode, das Gel zur Kathode zeigte. Der Transfer erfolgte unter Kühlung (4°C) bei einer Stromstärke von 600 mA (pro Gel), die Transferzeit betrug 1.5 h. Nach Durchführung des Western Blots wurde zur Detektion der Proteine ein Immunoprint durchgeführt (siehe unten).

C. 2.4. Immunoprint (Hsu & Fanger, 1981)

Lösungen

Puffer A (Wasch- und Blockierungspuffer): 150 mM NaCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 0.05 % (v/v) Tween, pH 7.2

Puffer B: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4

Substrat-Lösung: 15 mg 4-Chlor-1-naphthol in 5 ml Methanol, 500 μl 0.6 % (v/v) H_2O_2 , ad 30 ml Puffer B

Durchführung

Nach dem Western Blot wurden die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulose durch Inkubation mit dem Blockierungspuffer A (2 X 15 min bei Raumtemperatur) abgesättigt. Danach erfolgte eine Über-Nacht-Inkubation des 1. Antikörpers (1:500 - 1:2000 in Puffer A) auf einem Horizontaltisch bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen der Nitrocellulose mit Puffer A wurde zunächst 3 h bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten Antikörper, der gegen den 1. Antikörper gerichtet war (1:500 in Puffer A) inkubiert und anschließend 1 h mit dem BAP-Komplex (1:1000 in Puffer A; Präinkubation von Avidin und biotinylierter Peroxidase 30 Minuten bei Raumtemperatur). Nach erneutem Waschen wurde die Substrat-Lösung aufgetragen und entwickelt (5 - 10 min). Nach der Färbung wurde die Nitrocellulose mit aqua dest. gewaschen und luftgetrocknet (im Dunkeln).

C. 2.5. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek in $\lambda\text{gt}11$ (Kwok et al., 1985)

Die Konstruktion der cDNA-Bank aus menschlicher Leber-mRNA in $\lambda\text{gt}11$ wurde im Labor von S.L.C.Woo (Houston, USA) durchgeführt und ist im folgenden verkürzt wiedergegeben:

Die Isolierung von RNA aus humaner Leber erfolgte nach der Guanidin-Thiocyanat-Methode; anschließend wurde polyA-RNA über Chromatographie an Oligo(dT)-Sephadex gereinigt. Die Synthese des komplementären DNA-Strangs erfolgte mit Reverser Transkriptase und Oligo(dT) als Primer. Die Synthese des zweiten DNA-Strangs wurde mit DNA-Polymerase I und die Verdauung von Einzelstrangbereichen mit S1 Nuklease durchgeführt. Nach Einwirkung von Eco RI-Methylase wurden synthetische Eco RI-Linker an die cDNA-Fragmente ligiert und mit EcoRI-Restriktionsendonuklease nachbehandelt. Abschließend erfolgte die Ligierung mit $\lambda\text{gt}11$ -Armen, welche ebenfalls durch Eco RI-Behandlung erzeugt worden

waren, und die in vitro-Verpackung der rekombinanten DNA. Der Titer der Bank lag bei 10^7 pfu/ml; die Zahl der Rekombinanten in der Originalbibliothek betrug 2×10^6 . Von dieser Bibliothek wurden uns 30 μ l zur Verfügung gestellt (entsprechend ca. 2×10^5 Rekombinanten).

Die wesentlichen Merkmale des Expressionsvektors λ gt11 sind in Abb. 5 dargestellt.

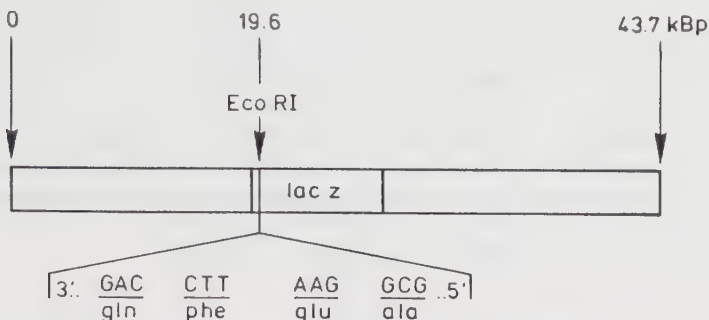


Abb. 5 Schematische Darstellung des Expressionsvektors λ gt11 im Bereich des lac z-Gens. Im unteren Teil der Abbildung sind vier Aminosäuren des C-terminalen Teils von β -Galaktosidase gezeigt; das zugrundeliegende Gen hat hier eine Eco RI-Schnittstelle (GAA TTC). (Vergleiche Abb. 6, Seite 18.)

C. 2.6. Amplifizieren einer Genbibliothek (Maniatis et al., 1982)

Lösungen

- L1: LB-Medium
1.0 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 0.5 % NaCl, pH 7,5
- L2: LB-Agar
1.5 % Agar in L1
- L3: LB-Soft-Top-Agarose
0.5 % Agarose in L1
- L4: 10 mM $MgSO_4$
- L5: λ -Verdünnungsmedium
10 mM Tris, 10 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$, pH 7.5

Durchführung

200 μ l einer Über-Nacht-Kultur von Y 1088 ($hsdR^- hsdM^+$) wurden mit ca. 10^5 pfu in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Inkubationsansatz wurde dann zu 3 ml Soft-Top-Agarose (L 3) gegeben (30 min bei 50°C vorinkubiert) und auf eine LB-Platte (L 2) ausplattiert. Nach dem Erkalten wurden die Platten bei 37°C inkubiert, bis die vollständige Lysis des Bakterienrasens erreicht wurde (6 - 8 h). Anschließend wurde die Top-Agarose mit einer gebogenen Pasteurpipettenspitze vorsichtig abgekratzt und in ein Falcon-Gefäß (50 ml) überführt. Die Platte wurde mit 5 ml λ -Verdünnungspuffer (L 5) nachgespült und der Puffer dann mit der Agarose vereinigt. Nach Zusatz von 100 μ l Chloroform wurde das Gefäß geschüttelt (15 min, 37°C) und die Agarose abzentrifugiert (10 min, 6000 g, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 0.3 % (v/v) Chloroform versetzt. Der resultierende Phagentiter lag typischerweise bei 10^{10} pfu/ml.

C. 2.7. Immunologische Testung der cDNA-Bibliothek (Young & Davis, 1983)

Lösungen

LB-Medium, LB-Agar: (C. 2.6.)

LB-Top-Agarose: 0.7 % Agarose in LB-Medium

IPTG-Lösung: 1 mM IPTG in aqua dest.

TBS-Puffer: 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4

Tween/TBS: 0.1 % (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer

Tween/BSA/TBS: 0.1 % (v/v) Tween 20, 3 % (w/v) Rinderserumalbumin in TBS-Puffer

4-Chlor-1-naphthol-Stammlösung: 17 mM 4-Chlor-1-naphthol ad 25 ml Methanol

Substratlösung: 5 ml 4-Chlor-1-naphthol Stammlösung und 500 μ l einer 0.6 % igen H_2O_2 - Lösung mit TBS-Puffer ad 30 ml

Durchführung

Der Phage λ gt11 ist gentechnologisch so manipuliert, daß er eine einzige EcoRI-Schnittstelle im 3'-terminalen Bereich des Gens für β -Galaktosidase enthält. Die Expression von cDNA-Fragmenten, die an dieser Stelle eingebaut sind, unterliegen der Kontrolle des lac Promotors; nach Induktion von lac z mit dem synthetischen Induktor IPTG (Isopropyl- β -D-galaktopyranosid)

kommt es zu einer massiven Expression eines β -Galaktosidase-Fusionsproteins. Der von der Fremd-DNA kodierte Proteinanteil kann dann immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 6).

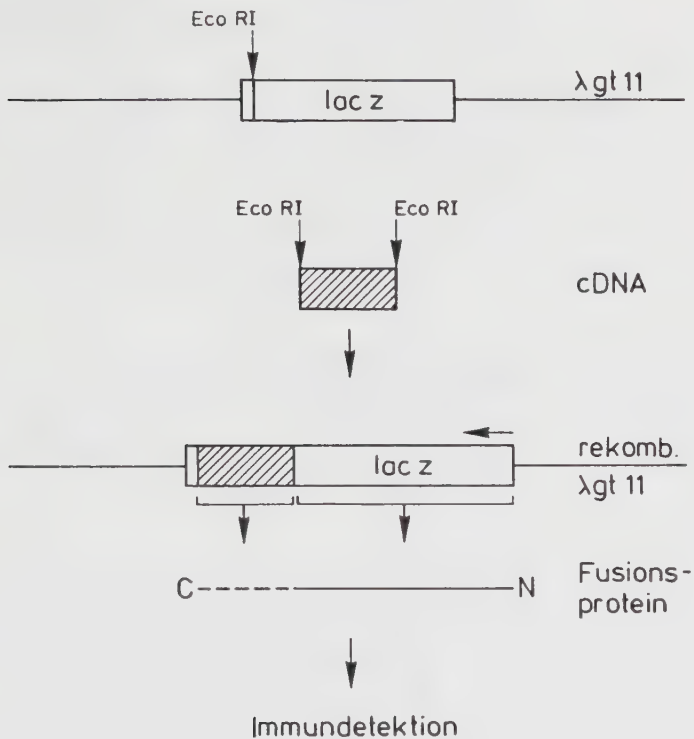


Abb. 6 Schematische Darstellung der Expression von β -Galaktosidase-Fusionsprotein im Phagen λ gt11

Die Testung der Genbibliothek erfolgte nach dem Prinzip des indirekten ELISA (1: spezifischer Antikörper; 2: biotinylierter Antikörper, der gegen den spezifischen Antikörper gerichtet ist; 3: Immundetektion mit Biotin-Peroxidase-Komplex; 4: Substrat-Reaktion mit 4-Chlor-1-naphthol) (Abb. 7).

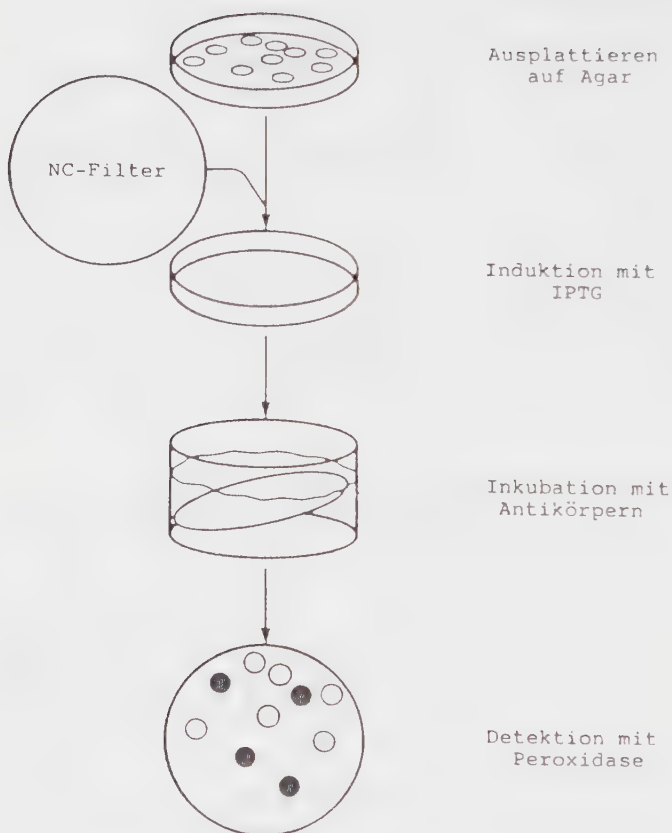


Abb. 7 Immunologische Testung einer cDNA-Bibliothek in λ gt11.

100 μ l (ca. 2×10^4 pfu) einer λ -Phagen-Suspension wurden mit 200 μ l einer Y 1090 -Kultur inkubiert (20 min, 37°C) und dann mit 3 ml Top-Agarose auf LB-Agar-Platten ($\varnothing$ 9 cm) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten (ca. 3h, 42°C) wurden Nitrocellulose-Membranen, die zuvor in 10 mM IPTG getränkt worden waren, auf die Top-Agarose aufgelegt. Die Filter wurden nach 3 h

Inkubation abgenommen, kurz mit TBS/Tween abgespült und dann zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen in TBS/Tween/BSA inkubiert (30 min).

Die Immundetektion des Fusionsproteins wurde wie folgt durchgeführt:

Zuerst erfolgte die Inkubation des Filters mit einem spezifischen Antikörper, der gegen C1-Inhibitor gerichtet ist (1:1000, über Nacht, RT). Dann wurde mit einem biotinylierten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, inkubiert (1:500, 2 h, RT). Die Detektion des zweiten Antikörpers erfolgte mit einem BAP-Komplex (1:1000, 30 min, RT) und 4-Chlor-1-naphthol als Substrat.

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit jeweils 20 ml TBS/Tween gewaschen (20 min); die Substrat-Reaktion wurde nach 5 - 15 Minuten durch Spülen der Filter mit Wasser gestoppt.

C. 2.8. Subklonierung von Phagen-Populationen (Maniatis et al., 1982)

Lösungen: siehe C. 2.7.

Durchführung

Die bei der Immundetektion positiv reagierenden Plaques wurden mit der größeren Öffnung einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestochen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in die 1 ml λ -Verdünnungspuffer und 10 μ l Chloroform vorgelegt worden waren. Nach einer Inkubation (6 h, 4°C), bei der die Phagen aus dem Agar herausdiffundieren konnten, wurde kurz zentrifugiert (2 min, 8000 g, RT) und der Überstand für eine erneute Plaque-Immundetektion (2. Runde) verwendet. Nach weiterem zweimaligem Subklonieren mit abnehmenden Phagenkonzentrationen (1×10^4 pfu/Platte bzw. 1×10^3 pfu/Platte) wurden pro Platte so wenige Phagen ausgesät, daß Einzelplaques deutlich unterschieden werden konnten (100 - 200 pfu/Platte). Die positiven Plaques wurden jetzt mit der Spitze einer Pasteurpipette ausgestochen; eine erneute immunologische Testung (5. Runde) ergab dann 100 % positive Phagen.

C. 2.9. Herstellung von Phagen-Stammlösungen mit hohem Titer (Maniatis et al., 1982)

Lösungen: siehe C. 2.6.

Durchführung

Die Herstellung von Phagen-Stammlösungen mit hohem Titer erfolgt nach dem Protokoll "Amplifizieren einer Genbank" (C. 2.6.); statt dem Bakterienstamm Y 1088 wurde der Stamm Y 1090 verwendet. Die Titer der resultierenden Phagenstammlösungen lagen bei $1 - 5 \times 10^{10}$ pfu/ml.

C. 2.10. Gewinnung von Phagen-DNA nach der Platten-Lysat-Methode (Chung et al., 1983)

Lösungen

LB-Top-Agarose: siehe C. 2.7.

TM-Puffer: 10 mM Tris, 20 mM MgSO_4 , pH 7.5

λ - Verdünnungspuffer: siehe C. 2.6.

PEG-Puffer: 2 M NaCl, 20 % Polyethylenglykol in λ - Verdünnungspuffer, pH 7.5

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

NZCYM-Medium: 1 % (w/v) NZ-Kasamino-Säuren, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl, 0.1 % (w/v) Kasamino-Säuren, 0.2 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 7.5

NZCYM-Agarose: 1.2 % (w/v) Agarose in NZCYM-Medium

Phenol-Lösung: gesättigte Lösung von Phenol in TE-Puffer

Durchführung

Üblicherweise wurden für eine Phagen-DNA-Präparation mindestens drei NZCYM-Agarose-Platten mit jeweils 1×10^5 pfu eingesetzt. Die Phagen (ca. 100 μl) wurden mit 200 μl einer Y-1090-Kultur inkubiert (20 min, 37°C) und dann mit 3 ml Top-Agarose ausplattiert. Die Platten wurden bei 42°C inkubiert (ca. 6 - 7 h), daraufhin mit 4 ml TM-Puffer überschichtet und 2 h bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde in Plastikgefäße (50 ml) überführt, zentrifugiert (10 min, 10 000 g, 4°C) und die Überstände zum Ausfällen der Phagen mit dem gleichen Volumen PEG-Puffer versetzt. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurde das Phagenpräzipitat abzentrifugiert (5 min, 10 000 g, 4°C), der Überstand verworfen und das Phagensediment in 1 ml TM-Puffer resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 min., 10 000 g, 4°C) wurde der Überstand mit 10 μg DNase I versetzt und im Wasserbad inkubiert (1 h, 37°C). Die Phagensuspension wurde nacheinander mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1X) und einem Volumen Chloroform (2X) extrahiert und die Phagen-DNA dann nach

Zusatz von Natriumacetat (0.3 M Endkonzentration) mit drei Volumina Ethanol abs. ausgefällt (30 min, - 70°C). Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (10 min, 8000 g, RT), in 0.5 ml TE-Puffer aufgenommen und mit 0.12 g festem Ammoniumacetat versetzt. Nach 15 Minuten auf Eis wurde das Proteinpräzipitat abzentrifugiert (10 min, 8000 g, RT). Die Nukleinsäuren im Überstand wurden mit drei Volumina Ethanol abs. präzipitiert, abzentrifugiert und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen (siehe oben). Diese Präzipitation wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Das Endprodukt wurde bei - 20°C gelagert.

C. 2.11. Verdauung von DNA mit Restriktionsenzymen (Maniatis et al., 1982)

Restriktionspuffer

Puffer L: 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5
Puffer M: 50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5
Puffer H: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5

Durchführung

Die Verdauungsansätze enthielten üblicherweise 0.2 - 1.0 µg DNA in 20 µl H₂O. Nach Zusatz von einer Einheit Restriktionsendonuklease und 3 µl des entsprechenden Restriktionspuffers (10 X) wurde das Volumen mit Wasser auf 30 µl gebracht. Die Reaktionsgefäße wurden im Wasserbad inkubiert (1 - 2 h, 37°C), und die Reaktion durch Erhitzen gestoppt (10 min, 65°C).

C. 2.12. Elektrophorese in Agarosegelen (Maniatis et al., 1982)

Lösungen

TBE-Elektroden-Puffer: 89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 0.1 % (w/v) Ethidiumbromid, pH 8.2
Probenpuffer: 54 % (v/v) Glycerin, 6 % (v/v) TBE-Puffer (10X), 0.2 % (w/v) SDS, 0.1 M EDTA, 0.02 % Bromphenolblau

Durchführung

Die Elektrophorese erfolgte in 1 % igen Agarose-Gelen. Die zu applizierenden Proben wurden mit 3 µl Probenpuffer vermischt und

in die Geltaschen überführt. Die anschließende Elektrophorese wurde bei 70 V und Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Elektrophoresedauer von 1 - 2 h konnten die DNA-Banden über die Fluoreszenz von eingelagertem Ethidiumbromid direkt nachgewiesen werden.

C. 2.13. Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen (Maniatis et al., 1982)

Lösungen: siehe C. 2.12.

Durchführung

Die Elektrophorese erfolgte wie unter C. 2.12. angegeben, nur daß wegen der niedrig schmelzenden Agarose ($T_m=65^{\circ}\text{C}$) unter Kühlung gearbeitet werden mußte. Die entsprechenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, die 200 μl TE-Puffer enthielten. Nach Inkubation im Heizblock (10 min, 65°C) wurden die Proben zuerst mit einem Volumen vorgewärmtem Phenol (37°C) und dann mit einem Volumen Chloroform (2X) extrahiert. Schließlich wurde die DNA aus der wäßrigen Phase mit Ethanol (2.5 Volumina) präzipitiert (30 min, -70°C) und der Niederschlag in TE-Puffer aufgenommen (Endkonzentration ca. 20 ng/ μl).

C. 2.14. Umklonierung von DNA in den Phagen M13

Das nachfolgende Protokoll (C. 2.14. - C. 2.15.) folgt dem "M13 cloning and sequencing handbook" (Fa. Amersham).

Der filamentöse Einzelstrang-Phage M13 (Abb. 8) ist gentechnologisch so manipuliert, daß er im Bereich des β -Galaktosidase-Gens eine multiple Klonierungsstelle enthält (Abb. 9). Durch den Einbau von Fremd-DNA in diesen Bereich wird die Enzymaktivität von β -Galaktosidase zerstört, und als Folge davon kann das chromogene Substrat X-Gal nicht mehr unter Bildung eines blauen Farbstoffs umgesetzt werden. Rekombinante Phagen bilden somit weiße, nicht-rekombinante dagegen blaue Plaques.

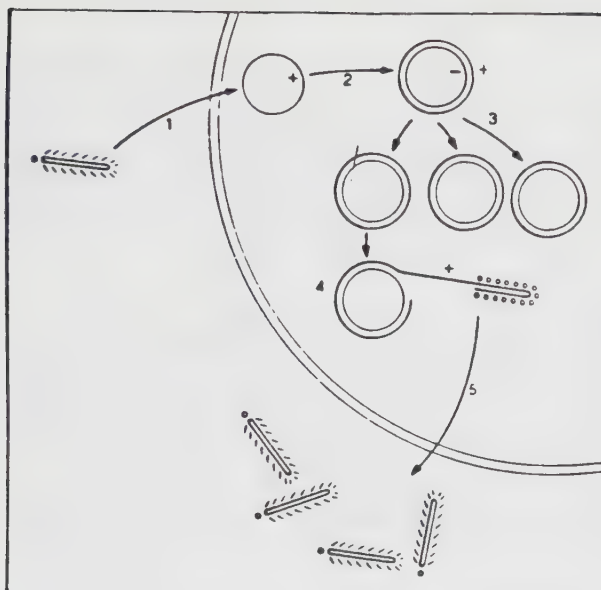


Abb. 8 Lebenszyklus des Phagen M13
 1: Phagen-Infektion von Wirtszellen über F-Pili
 2: Synthese eines Doppelstrangs (Replikative Form)
 3: Replikation von DNA
 4: Verpackung von Einzelstrang-DNA
 5: Ausschleusung von reifen Phagen

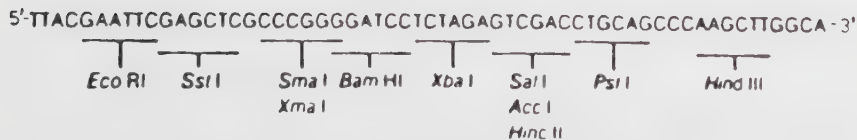


Abb. 9 Multiple Klonierungsstelle von M13 mp10

C. 2.14.1. Spaltung von M13 mit Restriktionsenzymen

Lösungen: siehe C. 2.11.

Durchführung

Die intrazelluläre RF-Form von M13 (ca. 2 µg) wurde mit dem gewünschten Restriktionsenzym (5 U) inkubiert (1 h, 37°C). Dann wurde ein Aliquot (0.4 µg) für eine Agarosegel-Elektrophorese entnommen, um den Verlauf der Spaltung zu kontrollieren. Bei unvollständiger Spaltung wurde die Probe nochmals inkubiert (1 h, 37°C) und dann analog C. 2.13. aufgearbeitet. Die resultierende linearisierte Phagen-DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen (10 ng/µl) und bei -20°C gelagert.

C. 2.14.2. Ligierung von M13 mit Fremd-DNA

Lösungen

10 mM ATP

50 mM DTT

Ligase-Reaktionspuffer (10X): 100 mM Tris, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, pH 7.5

Durchführung

Isolierte cDNA-Insertionen (100 ng/5 µl, C. 2.13.) und linearisierte M13-Vektor-DNA (20 ng/2 µl, C. 2.14.1.) wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 10X Ligase-Reaktionspuffer (1 µl), ATP (1 µl), DTT (1 µl) und T4 Ligase (1 µl = 0.5 U) gemischt und im Wasserbad inkubiert (16 h, 14°C). Die Reaktion wurde dann gestoppt (10 min, 65°C) und die Probe bis zur Transformation auf Eis gelagert.

C. 2.14.3. Transformation kompetenter Bakterienzellen mit rekombinanten M 13 - Phagen

Lösungen

L1 (10 X M9 Salze): 340 mM Na₂HPO₄, 220 mM KH₂PO₄, 190 mM NH₄Cl, 9 mM NaCl

Glucose-Minimal-Medium: L1 (1:10 verdünnt), 1 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM Thiamin HCl, 0.2 % Glucose.

2X TY-Medium: 1.6 % (w/v) Trypton, 1.0 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl

2X TY-Agar: 1.5% (w/v) in 2X TY-Medium

H-Agar: 1.0 % (w/v) Trypton, 0.8 % (w/v) NaCl, 1.2 % (w/v) Agar

H-Top-Agar: 1.0 % (w/v) Trypton, 0.8 % (w/v) NaCl, 0.8 % (w/v) Agar

50 mM CaCl₂

100 mM IPTG

2 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid

L2: 40 µl IPTG-Lsg., 40 µl X-Gal-Lsg., 200 µl JM 103-Zellen (logarithmische Wachstumsphase)

Durchführung

Vor der Präparation kompetenter E.coli-Zellen mußten diese auf F-Pilus-Synthese selektioniert werden, da ohne F-Pili keine M13 Infektion möglich ist. Die Geninformation für die F-Pilus-Synthese liegt auf einem Plasmid, das darüber hinaus auch ein Gen für die Prolin-Synthese trägt. JM 103 ist defizient hinsichtlich der Prolin-Synthese und kann daher auf Minimal-Medium nur dann wachsen, wenn er das gewünschte (komplementierende) Plasmid trägt. Die auf Glucose-Minimal-Platten gewachsenen Einzelkolonien wurden bis zu einem Monat nach der Aussaat als Inokulate verwendet.

I. Gewinnung von kompetenten Zellen

10 ml 2X TY-Medium wurden mit einer selektionierten E.coli-Kolonie (siehe oben) beimpft und unter Schütteln inkubiert (über Nacht, 37°C). 0.5 ml aus dieser Kultur wurden dann zu 40 ml 2X TY-Medium gegeben und solange unter Schütteln inkubiert, bis eine optische Dichte bei 578 nm von ca. 0.3 erreicht war (ca. 1 h). Die Zellen wurden abzentrifugiert (2 min, 6000 g, 4°C) und in 20 ml 50 mM CaCl₂ (4°C) aufgenommen. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (2 min, 6000 g, 4°C) und in 4 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen waren nun bereit für die Transformation und wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

II. Transformation von Zellen

Die Ligierungsansätze aus C. 2.14.2 wurden halbiert (finales Volumen 5 µl), jeweils mit 0.3 ml kompetenten Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt und inkubiert (1 - 2 h, Eisbad). Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock unterworfen (3 min,

42°C) und entweder direkt ausplattiert oder bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

III. Ausplattieren der Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 3 ml H-Top-Agar in einem Reagensglas vorinkubiert (20 min, 42°C). Dazu wurden dann 280 µl Lösung L 2 und das Transformationsgemisch (300 µl, siehe oben) pipettiert, und der Inhalt des Reagensglases sofort auf eine vorgewärmte H-Agar-Platte (37°C) verteilt. Nach Erkalten des Top-Agars wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Weiße Plaques, die keine β-Galaktosidase-Aktivität aufwiesen, wurden zur Isolierung von rekombinanter Einzelstrang-DNA verwendet (C. 2.15.).

IV. Kontrollen

Folgende Kontrollen (ohne Zusatz von Fremd-DNA) wurden mit jeweils zwei Platten bei jedem Transformationsversuch durchgeführt:

- 1) Eco RI-verdauter Vektor (10 ng/Platte)
- 2) Eco RI-verdauter und mit Ligase religierter Vektor (Ligationskontrolle, 10 ng/Platte)
- 3) Unverdauter Vektor (1 ng/Platte)

Bei einem regulär durchgeführten Transformationsversuch sollte man ≥ 200 blaue Plaques/Platte für den ungeschnittenen Vektor erwarten (Kontrolle 3). Der geschnittene (linearisierte) Vektor (Kontrolle 1) sollte keine oder nur sehr wenige Plaques ergeben. Der geschnittene und religierte Vektor (Kontrolle 2) dient als Kontrolle für etwaige Exonuklease-Aktivität in jedem Schritt des Klonierungsexperiments; partielle Verdauung durch Verunreinigungen mit Restriktionsenzymen führen zur Inaktivierung des β-Galaktosidase-Gens, was zur Bildung weißer Plaques führen würde.

C. 2.15. Isolierung von rekombinanter Einzelstrang-DNA des Phagen M13

Lösungen

2X TY-Medium: siehe C. 2.14.3.

PEG-Lösung: siehe C. 2.10.

TE-Puffer: siehe C. 2.10.

Phenol-Lösung: siehe C. 2.10.

Durchführung

1 ml einer E.coli-Kultur von JM 103 (über Nacht, 37°C) wurden zu 100 ml 2X TY-Medium gegeben und davon Aliquots a 1.5 ml auf Plastikgefäße (Falcon, 10 ml) verteilt. Jedes Gefäß wurde mit einem weißen Plaque aus dem Transformationsansatz (C. 2.14.3.) beimpft und unter Schütteln inkubiert (5 h, 37°C). Die Bakteriensuspension wurde dann auf Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zweimal zentrifugiert (5 min, 8000 g, RT), wobei der Überstand jedesmal auf neue Reaktionsgefäße transferiert wurde. Nach Zusatz von PEG-Lösung (200 µl) zum Präzipitieren der Phagen (15 min, RT) wurde zuerst zentrifugiert (5 min, 8000 g, RT), der Überstand abgenommen und dann nochmals 2 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach vollständiger Entfernung des Überstands wurde das Phagenpräzipitat in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und mit jeweils 50 µl Phenol (1X), Phenol/Chloroform (1X) und Chloroform (2X) extrahiert. Die Phagen-DNA wurde aus der wäßrigen Phase nach Zusatz von 3 M Natriumacetat (10 µl) mit Ethanol (250 µl) präzipitiert (30 min, -70°C). Nach dem Zentrifugieren (10 min, 8000 g, RT) wurde das Präzipitat in 50 µl TE-Puffer gelöst (ca. 100 ng DNA/µl). Die so gewonnene rekombinante Einzelstrang-DNA von M13 konnte direkt für die Sequenzierung verwendet werden.

C. 2.16. Sequenzierung von DNA nach der Didesoxy-Terminations-Methode (Sanger et al., 1977)

Lösungen

TE-Puffer: siehe C. 2.10.

Klenow-Reaktions-Puffer (10X): 100 mM Tris, 50 mM MgCl₂

M13 Universal Primer (18mer): 2ng/µl

Desoxy-NTP-Arbeitslösungen (dNTP): Je 0.5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in aqua bidest.

Desoxygemische für das Sequenzieren mit (α -³²P)dATP oder (α -³⁵S)dATP α S

	A [○]	C [○]	G [○]	T [○]
0.5 mM dCTP	20 μ l	1 μ l	20 μ l	20 μ l
0.5 mM dGTP	20 μ l	20 μ l	1 μ l	20 μ l
0.5 mM dTTP	20 μ l	20 μ l	20 μ l	1 μ l
TE-Puffer	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Didesoxy-NTP-Arbeitslösungen (ddNTP):

0.15 mM ddATP	0.05 mM ddGTP
0.02 mM ddCTP	0.5 mM ddTTP

dNTP/ddNTP-Gemische: Je 25 μ l A[○] + 0.15 mM ddATP, C[○] + 0.02 mM ddCTP, G[○] + 0.05 mM ddGTP und T[○] + 0.5 mM ddTTP. Aliquots á 2 μ l wurden bei - 20°C gelagert.

dNTP-Mischung: Je 50 μ l von dNTP mischen (finale Konzentration der einzelnen dNTP: 0.125 mM). Aliquots á 2 μ l wurden bei - 20°C gelagert.

Farbmarker-Lösung:

0.1 % (w/v) Xylene Cyanol FF, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 20 mM Na₂EDTA in Formamid (mit Amberlite-Harz 30 min vorbehandelt)

Durchführung

A. Hybridisierung Oligonukleotid-Primer und DNA-Matrize

PM-Lösung:

M13 Einzelstrang-DNA (Matrize, C. 2.15.)	5 μ l (ca. 200-300 ng)
M13 Primer	1 μ l (2 ng)
Klenow-Reaktionspuffer (10 X)	1.5 μ l
Aqua bidest.	2.5 μ l

Die angeführten Lösungen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und in einem Trockenschrank inkubiert (2 h, 60°C). Diese Mischung wurde dann direkt für die Sequenzierung eingesetzt oder über Nacht bei - 20°C gelagert.

B. Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktionen wurden bei Raumtemperatur und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1.5 ml) durchgeführt. Pro DNA-Ma-

trize wurden jeweils 2 µl der entsprechenden dNTP/ddNTP-Gemische auf vier gekennzeichnete Reaktionsgefäße (A, C, G, T) verteilt und diese dann in eine Mikrozentrifuge gestellt. Zur PM-Lösung (siehe oben) wurden 3 µl (α -³⁵S)dATP α S (600 Ci/mmol) und 1 µl (1U) DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) pipettiert und durch mehrmaliges vorsichtiges Aufziehen in die Pipette kurz gemischt. Dann wurden jeweils 2,5 µl auf die vier Reaktionsgefäße verteilt und die Reaktion durch einen Puls der Zentrifuge gestartet.

Nach 20 min wurden pro Reaktionsgefäß 2 µl dNTP-Mischung zugesetzt, und nach weiteren 15 min wurde die Reaktion mit jeweils 4 µl Farbmarkerlösung gestoppt.

C. 2.17. Elektrophorese im keilförmigen Polyacrylamid/Harnstoff-Gel (Garoff & Ansorge, 1981)

Lösungen

Elektrodenpuffer: 100 mM Tris, 83 mM Borsäure, 1 mM Na₂EDTA, pH 8.6

Polyacrylamid/Harnstoff-Lösung: 7 M Harnstoff, 5.71 % (w/v) Acrylamid, 0.29 % (w/v) Bis-Acrylamid, 0.08 % (w/v) Ammoniumpersulfat, 0.05 % (v/v) TEMED in Elektrodenpuffer

Durchführung

Die Elektrophorese wurde in keilförmigen Gelen (Dicke: 0.1 - 0.4 mm; Breite: 21 cm; Länge: 53 cm) mit 6 % Polyacrylamid/7M Harnstoff bei einer Temperatur von 50°C in einer Makrophor-Kammer (LKB) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Proben 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis zwischengelagert. Die Vorelektrophorese wurde 30 min bei 1500 V durchgeführt, dann wurden pro Lauflinie 2.5 µl DNA-Lösung auf das Gel appliziert. Die Elektrophoresedauer betrug 3 h bei 2500 V.

C. 2.18. Autoradiographie der Sequenz-Gele

Lösung

10 % (v/v) Essigsäure

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt und dann zum Fixieren 10 min in Essigsäure geschüttelt. Das Gel wurde mit einem starken Wasserstrahl ge-

waschen (5 min) und mit einem Heißluftgebläse getrocknet (ca. 20 - 30 min). Anschließend wurde ein Kodak X-Omat S-Film (20 X 40 cm) auf das Gel gelegt und mit einer Glasplatte fixiert. Die Expositionszeit betrug üblicherweise 16 - 20 h bei Raumtemperatur.

C. 2.19. Gewinnung von rekombinantem Antigen aus lysogenen Zellen (Huynh et al., 1985)

Lösungen

0.2% (w/v) Maltose in LB-Medium: siehe C. 2.6.

10 mM $MgCl_2$

1 M IPTG-Stammlösung

λ -Verdünnungspuffer: siehe C. 2.6.

TM-Puffer: 10 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, pH 7.5

Durchführung

I. Gewinnung von lysogenen Y 1089 - Zellen mit rekombinantem λ gt11

Eine Kultur von E.coli Y 1089 in LB-Medium/0.2 % Maltose (10 ml über Nacht bei 37°C inkubiert) wurde zentrifugiert (10 min, 4000 g, 4°C) und in 30 ml $MgCl_2$ -Lösung aufgenommen. Aliquote der Zellsuspension wurden mit rekombinanten λ gt11 Phagen (C. 2.9.) in einem Verhältnis von Phage:Zelle = 10 : 1 (Gesamtvolumen 20 μ l) gemischt und inkubiert (20 min, 32°C). Aus diesem Ansatz wurden ca. 100 Zellen pro LB-Agar-Platte ausplattiert und bei 32°C inkubiert (bei dieser Temperatur ist der temperatursensitive Phagenrepressor noch funktionsfähig). Nach Wachstum der Kolonien bis zu einem Durchmesser von 1 - 2 mm wurden von den Platten mit Hilfe eines Stempels jeweils zwei identische Replikate angefertigt und diese bei 32°C bzw. 42°C inkubiert. Zellklone, die bei 32°C wachsen, bei 42°C aber nicht, sind lysogen (bei 42°C ist der Phagenrepressor inaktiv, die Phagensynthese und somit der Infektionszyklus des Virus kann induziert werden). Die identifizierten lysogenen Kolonien wurden nochmals auf zwei Platten ausgestrichen und erneut bei 32°C bzw. 42°C inkubiert.

II. Präparation von Lysaten lysogener Zellen

30 ml LB-Medium (Plastikgefäß, 50 ml) wurden mit einer lyso-genen Kolonie beimpft und unter Schütteln bei 32°C inkubiert, bis eine optische Dichte bei 578 nm von 0.5 erreicht war. Die Temperatur der Kultur wurde dann rasch auf 42 - 45°C erhöht und die Inkubation weitere 20 min fortgesetzt. Nach Zusatz von IPTG zu einer Endkonzentration von 10 mM wurde nochmals eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Zellen dann bei 25 - 30°C abzentrifugiert (5 min, 6000 g). Die Zellen wurden in 600 µl TM-Puffer (2 % des Ausgangsvolumens) resuspendiert und das Gefäß dann 5 min in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach Auftauen bei RT wurde das Lysat mit 10 µg DNase I inkubiert (30 min, 37°C), dann zentrifugiert (10 min, 8000 g, RT) und der Überstand bei - 20°C gelagert. Die Analyse der Fusionsproteine erfolgte nach C. 2.2 - C. 2.4.).

C. 2.20. BrCN-Spaltung von C₁⁻-Inhibitor

Zur Lokalisierung der Kohlenhydratseitenketten im C₁⁻-Inhibitor-Molekül wurde das Protein einer BrCN-Spaltung unterworfen. Da aufgrund der vollständigen cDNA-Sequenz die genaue Lage der Methionine bekannt war und damit auch das Molekulargewicht der Fragmente, sollte es möglich sein, die Lage der Kohlenhydratseitenketten über eine SDS-Elektrophorese näher einzugrenzen.

Lösungen

70 % (v/v) Ameisensäure

20 % (w/v) BrCN-Lösung

Puffer A: 6 M Guanidin-Hydrochlorid, 0.1 M Tris, 0.01 M EDTA, pH 8.0

Durchführung

Zur Erzeugung von Fragmenten durch BrCN-Spaltung wurde humaner C₁⁻-Inhibitor in 70 %iger Ameisensäure gelöst (Endkonzentration ca. 1 mg/200 µl) und mit dem gleichen Volumen an 20 %iger BrCN-Lösung vermischt. Nach 2 h Inkubation bei RT (Reaktionsgefäß abgedunkelt) wurde zweimal ein 10faches Volumen an aqua dest. zugegeben und jeweils am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das Spaltprodukt wurde in Puffer A aufgenommen (1 - 2 ml) und dann 2-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 5 % (v/v) zugesetzt. Nach Inkubation des Gemisches

(2 h, 37°C) wurde Methyljodid zugegeben (Endkonzentration 5 %), das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült und 15 min kräftig geschüttelt. Nach Dialyse gegen 20 mM Ammoniumformiatlösung (über Nacht, 4°C) wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

C. 2.21. Isolierung von Fragmenten aus der BrCN-Spaltung mittels FPLC

Lösungen

70 % Ameisensäure

Durchführung

Die Isolierung der BrCN-Fragmente erfolgte durch FPLC. Eine Superose 12 (HR 10/30)-Säule wurde 3 h mit 70 % Ameisensäure äquilibriert (Flußrate 0.5 ml/min). Nach Injektion des Fragmentgemisches aus der BrCN-Spaltung (100 µl), wurde mit der Äquilibriumslösung eluiert (Flußrate: 0.5 ml/min; Druck: 1.5 mPa). Die Messung der Absorption erfolgte bei 280 nm. Die Fraktionen á 500 µl wurden lyophilisiert und in 50 µl 20 mM Ammoniumformiatlösung aufgenommen; davon wurden für die Deglykosylierung jeweils 5 µl eingesetzt (C. 2.22.).

C. 2.22. Inkubation von C₁-Inhibitor-Fragmenten mit Endoglykosidase F

Lösungen

Inkubationspuffer: 20 mM Kaliumphosphat, 50 mM EDTA, 0.1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 7.2

Durchführung

5 µl/Fraktion aus C. 2.21. wurden lyophilisiert, mit 20 µl Inkubationspuffer aufgenommen und zusammen mit Endoglykosidase F (1 U) inkubiert (24 h, 37°C). Die deglykosylierten Fragmente wurden direkt für die SDS-Elektrophorese (C.2.1. - C. 2.2.) verwendet.

D. ERGEBNISSE

D. 1. Amplifizieren einer λ gt11 cDNA-Bibliothek

Ein Teil einer λ gt11 cDNA-Bibliothek (30 μ l = 2×10^5 Rekombinanten) wurde in E.coli Y 1088 amplifiziert (C. 2.6.). Nach dem Amplifizieren betrug der Titer 4.5×10^{10} pfu/ml, was im erwarteten Bereich lag.

D. 2. Immunologische Testung einer humanen Leber-cDNA-Bibliothek in λ gt11

D. 2.1. Durchmusterung der cDNA-Bibliothek mit spezifischen Antikörpern gegen C $\bar$ I-Inhibitor

Von der amplifizierten cDNA-Bibliothek (D. 1.) wurde eine $1 : 10^5$ -Verdünnung erstellt (4.5×10^5 pfu/ml) und davon jeweils 50 μ l (ca. 2×10^4 pfu) auf 15 Agar-Platten ausplattiert (C. 2.7.); somit wurden insgesamt ca. 3×10^5 Phagen (ca. 2×10^5 Rekombinanten) untersucht. Die anschließende Immundetektion von C $\bar$ I-Inhibitor-Fusionsprotein auf Nitrozellulosefiltern (1. Antikörper: anti-C $\bar$ I-Inhibitor-IgG (Kaninchen); 2. Antikörper: anti-(Kaninchen-IgG)-IgG, biotinyliert; 3. Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex; Substrat: 4-Chlor-1-naphthol) ergab 107 positive Signale. Dies entspricht ca. 0.03 % der Gesamtzahl an Rekombinanten.

D. 2.2. Subklonieren von Phagen-Populationen

Von den 107 positiven Plaques aus D. 2.1 wurden 15 willkürlich ausgesucht und weiter vereinzelt (C. 2.8.). So konnten nach drei Testrunden mit abnehmender Plaquedichte (1×10^4 , 1×10^3 und 1×10^2 pfu/Platte) schließlich 12 definierte Einzelplaques isoliert werden, deren Phagen in der abschließenden 5. Testrunde nur noch positive Signale lieferten. Die erhaltenen Phagenklone wurden mit C1I-1 bis C1I-12 benannt. In der abschließenden Testrunde wurden negative Kontrollen mit Antikörpern gegen menschliches HMW-Kininogen bzw. menschliches Albumin durchgeführt (je 1:1000). In beiden Fällen konnten keine positiven Signale mit den C $\bar$ I-Inhibitor-Klonen beobachtet werden; damit wurde ein zusätzliches Spezifitätskriterium für die verwendeten Antikörper bzw. das Detektionssystem erbracht. Darüberhinaus wurden in einem weiteren Experiment Phagen mit dem chromogenen Substrat X-Gal ausplattiert (C. 2.14.3.). Dabei zeigte sich, daß nur weiße

Plaques auftraten; daraus wurde der Schluß gezogen, daß sämtliche 12 Phagen-Klone rekombinante DNA enthalten.

Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte ist in Abb. 10 wiedergegeben.

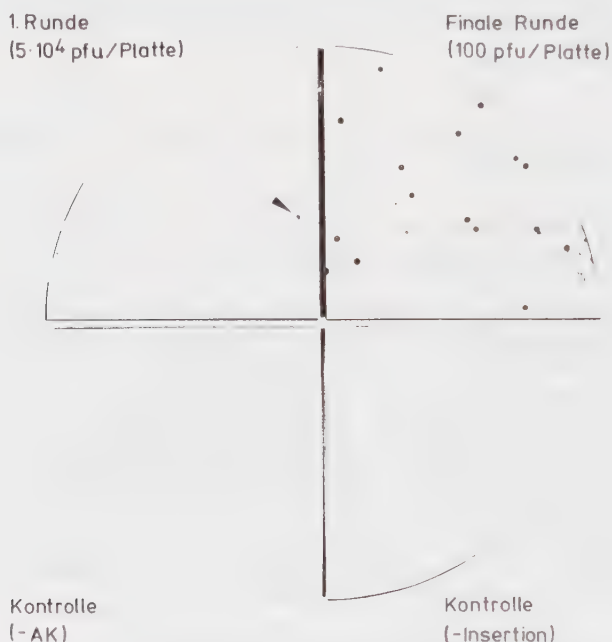


Abb. 10 Zusammenfassung einzelner Schritte bei der immunologischen Testung einer λ gt11 cDNA-Bibliothek aus humaner Leber-mRNA mit affinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen Antikörpern gegen menschlichen C1-Inhibitor.

D. 3. Immunologische Testung C1-Inhibitor-spezifischer Klone mit monoklonalen Antikörpern gegen C1-Inhibitor

Die zwölf positiven Klone aus D. 2.3 (C1I-1 bis C1I-12) wurden mit einem Gemisch aus sieben monoklonalen Antikörpern

gegen C $\bar{I}$ -Inhibitor immunologisch getestet. 3 μ l einer hochkonzentrierten Phagenlösung (ca. 10^7 pfu/ml) wurden dafür direkt auf den Bakterienrasen (E.coli Y 1090) einer Agarplatte appliziert und die Immundetektion analog D. 2. durchgeführt; der zweite Antikörper war ein biotinyliertes anti-(Maus-IgG)-IgG aus Ziege. Die einzelnen monoklonalen Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt; als Kontrollen dienten ein Klon ohne Insertion (λ gt11-Wildtyp) sowie ein Klon mit einer Insertion, die für das Plasma-Protein Inter- α -Trypsin-Inhibitor kodiert (Abb. 11).

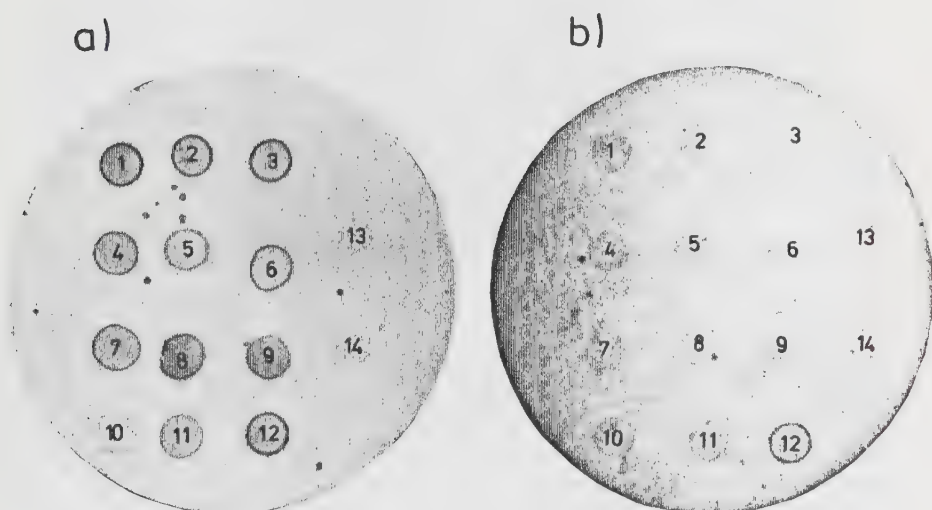


Abb. 11 1 - 12: Immunologische Testung der Klone C1I-1 bis C1I-12 mit polyklonalen (a) und einem Gemisch von monoklonalen Antikörpern (b) gegen C $\bar{I}$ -Inhibitor.
 13: λ gt 11 mit cDNA-Insertion für Inter- α -Trypsin-Inhibitor
 14: λ gt 11 ohne Insertion (Wildtyp)

Erwartungsgemäß ergaben die Klone C1I-1 bis C1I-12 mit polyklonalen Antikörpern gegen C $\bar$ I-Inhibitor ein deutlich positives Signal, während das Gemisch aus monoklonalen Antikörpern nur mit Klon C1I-12 eine schwache, aber dennoch eindeutig positive Reaktion zeigte. Keiner der Kontrollklone reagierte mit den spezifischen Antikörpern gegen C $\bar$ I-Inhibitor.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man mit sehr großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, daß Klon C1I-12, der von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen C $\bar$ I-Inhibitor erkannt wird, eine für C $\bar$ I-Inhibitor kodierende cDNA-Insertion enthält. Im folgenden wurden nun die Insertionsgrößen der Klone C1I-1 bis C1I-12 bestimmt.

D. 4. Herstellung von Phagen-Stammlösungen mit hohem Titer

Je Klon wurden 20 μ l Phagensuspension aus D. 3. mit Soft-Top-Agarose auf Agar-Platten ausplattiert (C. 2.9.), was in allen Fällen zu konfluentem Wachstum führte. Nach Extraktion der Top-Agarose mit jeweils 5 ml TM-Puffer lag der Phagen-Titer im Überstand bei $1 - 5 \times 10^{10}$ pfu/ml.

D. 5. Isolierung von Phagen-DNA und Bestimmung der Größe der cDNA-Insertionen

Um zu bestimmen, welcher Klon die größte cDNA-Insertion enthält, wurden je 3 NZYCM-Platten mit 1×10^5 pfu pro Klon (C1I-1 bis C1I-12) beschickt, und die daraus isolierte DNA (C. 2.10) mit jeweils 5 U Eco RI inkubiert (1 h, 37°C). Die Proben wurden auf ein Agarosegel (1 %) appliziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Klon C1I-12 enthielt zwei Insertionen mit 1.2 kBp und 0.6 kBp Länge, während sämtliche anderen Klone deutlich kleinere Insertionen (<1.0 kBp) aufwiesen. Aufgrund der Ergebnisse von D. 3. und D. 5. wurde Klon C1I-12 für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Zur Verifizierung dieser Befunde und zum Ausschluß eines Artefakts wurde ein erneuter Eco RI Verdau der C1I-12-DNA elektrophoretisch analysiert; als Kontrollen dienten dabei λ gt11-Wildtyp-DNA und eine λ gt11-DNA mit einer cDNA-Insertion von 2.8 kBp Länge, die für Ovalbumin kodiert (Abb. 12).



Abb. 12 Agarosegel-Elektrophorese (1 %) der Spaltung der isolierten DNA von C1I-12, Ov.1 und λ gt11 mit Eco RI. Die Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid.
 1: DNA-Marker (1 μ g) (siehe C. 1.2.)
 2: C1I-12/Eco RI (ca. 2 μ g)
 3: Ov.1 /Eco RI (ca. 2 μ g)
 4: λ gt11 /Eco RI (ca. 2 μ g)

Klon C1I-12 zeigte die genannten Insertionen von 1.2 bzw. 0.6 kBp, während Ov.1 eine Insertion von 2.8 kBp und λ gt11 erwartungsgemäß keine Insertion enthielt. C1I-12 enthält also offensichtlich eine cDNA-Insertion von 1.8 kBp Länge mit einer internen Eco RI-Schnittstelle; diese cDNA könnte für das gesamte C1-Inhibitor-Protein kodieren (bei ca. 500 Aminosäuren erwartet man einen kodierenden Bereich von 1.5 kBp). Aufgrund der Ergebnisse von D. 3. und D. 5. wurde Klon C1I-12 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

D. 6. Präparative Darstellung der cDNA-Insertion von Klon C1I-12

D. 6.1. Restriktionsverdauung von C1I-12 DNA mit Eco RI

Zur Isolierung der cDNA-Insertion von Klon C1I-12 wurden 10 NZYCM-Platten mit je 1×10^5 pfu beschickt und die daraus gewonnene DNA (C. 2.10.) mit 20 U Eco RI inkubiert (1 h, 37°C). Die Proben wurden in 5 Portionen aufgeteilt und dann auf ein Agarosegel appliziert (1 % niedrig schmelzende Agarose). Die Elektrophoresebedingungen waren analog D. 5., nur daß unter Kühlung gearbeitet werden mußte (Abb. 13).

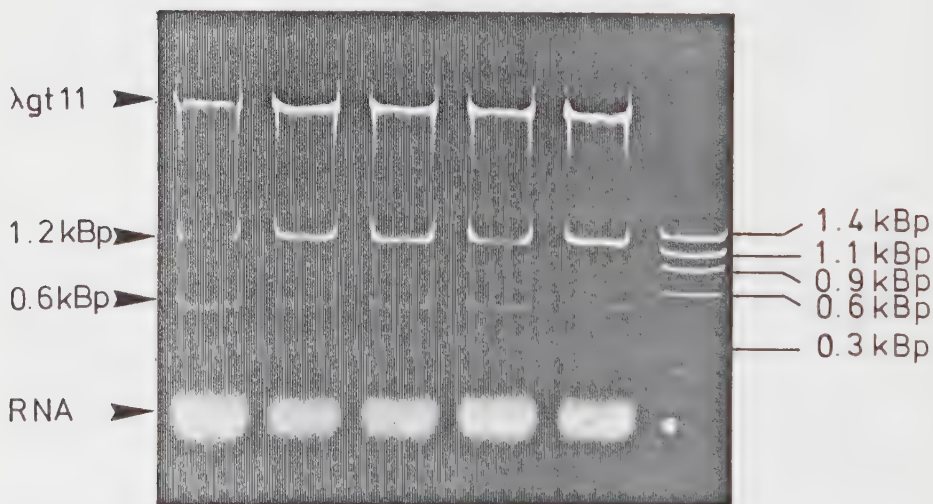


Abb. 13 Präparative Agarosegel-Elektrophorese (1 %) der Spaltung der isolierten DNA von C1I-12 mit Eco RI. Die Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid.

1 - 5: C1I-12/EcoRI (ca. 2 µg/Lauflinie)

6: Marker-DNA (1 µg)(siehe C. 1.2.)

D. 6.2. Isolierung der cDNA-Insertionen von C1I-12 aus einem präparativen Agarosegel

Die Insertionen wurden aus dem Gel ausgeschnitten, vereinigt und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach Schmelzen der Agarose und Phenol/Chloroform-Extraktion (C. 2.13) konnten die gereinigten Fragmente durch Ethanolpräzipitation gewonnen werden. Die Reinheit der DNA wurde anhand einer Agarosegel- Elektrophorese überprüft (Abb. 14).

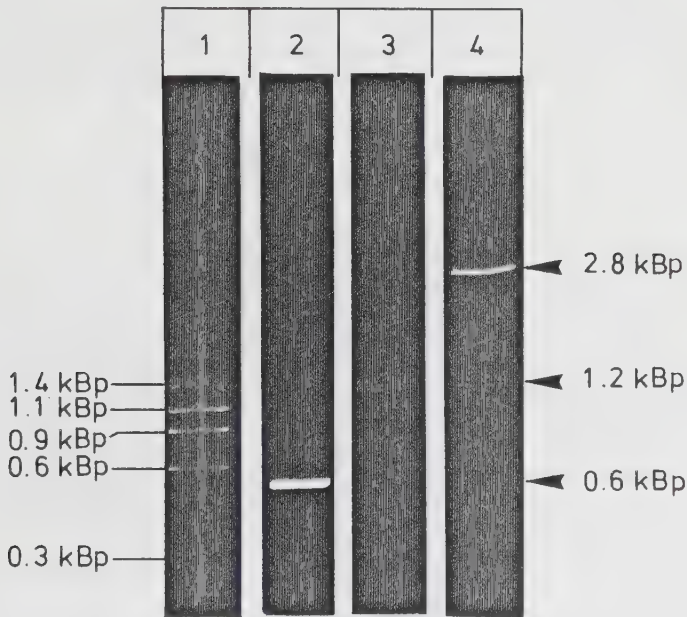


Abb. 14 Agarosegel-Elektrophorese (1 %) der gereinigten cDNA-Insertionen von C1I-12 und Ov.1. Die Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid.

1: Marker-DNA (1 µg) (siehe C. 1.2)

2: 0.6 kBp Fragment aus C1I-12 (ca. 1µg)

3: 1.2 kBp Fragment aus C1I-12 (ca. 1µg)

4: 2.8 kBp Fragment aus Ov.1 (ca. 1µg)

Die Fragmente konnten in guten Ausbeuten (ca. 80 %) aus dem Gel isoliert werden und zeigten in der Elektrophorese jeweils eine einheitliche Bande. Die so gewonnenen cDNA-Insertionen von C1I-12 wurden direkt für die Klonierung in den Phagen M13 mp10 verwendet.

D. 7. Subklonierung von C1-Inhibitor-spezifischen cDNA-Fragmenten in den Phagen M13 mp10

D. 7.1. Spaltung von M13 mp10 mit Eco RI

Um linearisierte Vektor-DNA zu gewinnen, wurden 2 µg M13 mp10 mit 4 U Eco RI 2 h bei 37°C inkubiert (C. 2.14.1.). Die Vollständigkeit der Spaltung wurde anhand einer Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abb. 15).

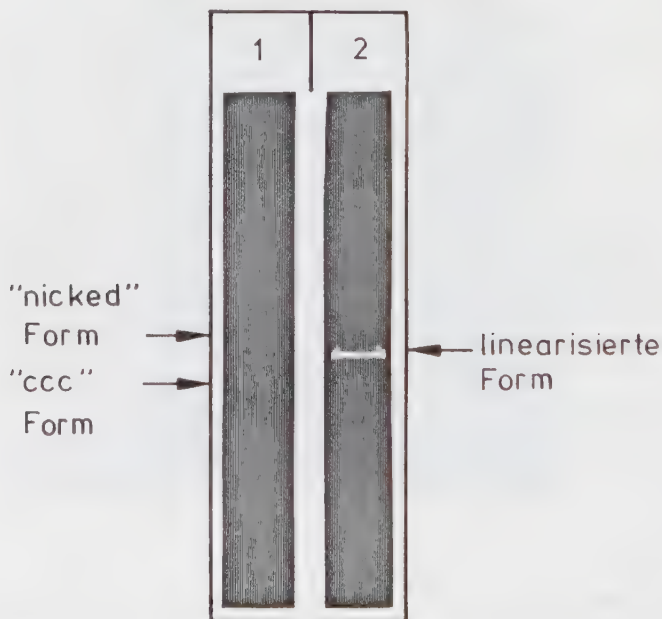


Abb. 15 Agarosegel-Elektrophorese (1 %) von M13 mp10 vor und nach der Spaltung mit Eco RI. Die Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid.

1: M13 mp10 (ca. 100ng)

2: M13 mp10/Eco RI (ca. 100ng)

Unmodifizierter M13 mp10 zeigte das typische Bandenmuster, mit einer schneller wandernden hyperverdrillten ccc-("covalently closed circular") Form und der teilweise entspiralisierten ("nicked") Form, die langsamer wandert. Die Vollständigkeit der Spaltung des Vektors wurde durch das Auftreten einer Bande mit einer mittleren elektrophoretischen Mobilität bestätigt.

D. 7.2. Ligierung von Vektor M13 mp10 mit C1I-Inhibitor-spezifischen cDNA-Fragmenten

Pro Ligierungsansatz wurden 20 ng des linearisierten Vektors M13 mp10 und je 100 ng der cDNA-Fragmente von C1I-12 (1.2 kBp und 0.6 kBp) bzw. Ov.1 (2.8 kBp) zusammen mit T4 Ligase (0.5 U) inkubiert (16 h, 14°C) und dann bis zur Transformation auf Eis gelagert (C. 2.14.2.).

D. 7.3. Transformation kompetenter Zellen mit rekombinanter M13 mp10-DNA

Jeweils die Hälfte der Transformationsansätze aus D. 7.2. wurde mit 0.3 ml kompetenten JM 103-Zellen inkubiert (2 h, 4°C) und zusammen mit IPTG, X-Gal und H-Top-Agarose auf H-Agar-Platten ausplattiert (C. 2.14.3.). Als Kontrolle dienten jeweils zwei Platten mit ungeschnittenem Vektor (0.5 ng/Platte), geschnittenem Vektor (5 ng/Platte) und geschnittenem und religiertem Vektor (5 ng/Platte). Ein typisches Transformationsergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Insgesamt konnten 3 rekombinante Phagen mit der 0.6 kBp-Insertion und 4 rekombinante Phagen mit der 1.2 kBp-Insertion gewonnen werden.

Ligationsansatz	Zahl der Plaques/Platte	
	blau	weiß
M13 mp10/Eco RI + C1I-12 (0.6 kBp)	12/41	2/1
M13 mp10/Eco RI + C1I-12 (1.2 kBp)	32/16	3/1
M13 mp10/Eco RI + Ov.1 (2.8 kBp)	17/11	1/2
M13 mp10	150/200	0/0
M13 mp10/Eco RI	17/12	0/0
M13 mp10/Eco RI + T4-Ligase	150/280	1/0

Tab. 1 Transformation von E.coli JM 103 mit rekombinanter M13 mp10-DNA; die Ergebnisse von je 2 Platten sind getrennt angegeben.

D. 7.4. Isolierung von rekombinanter Einzelstrang-DNA des Phagen M13 mp10

Jeweils 1.5 ml einer Kultur von JM 103 wurden mit einem isolierten (weißen) Plaques aus D. 7.3. beimpft und 5 h bei 37°C inkubiert (C. 2.15). Aus dem Zellüberstand konnten M13-Phagen mit Polyethylenglykol präzipitiert werden und deren DNA nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Ethanolpräzipitation gewonnen werden. Die Reinheit der Präparation wurde durch Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abb. 16). Dabei zeigten sich deutliche Größenunterschiede in den homogenen DNA-Präparationen je nach Größe der eingebauten Insertion.

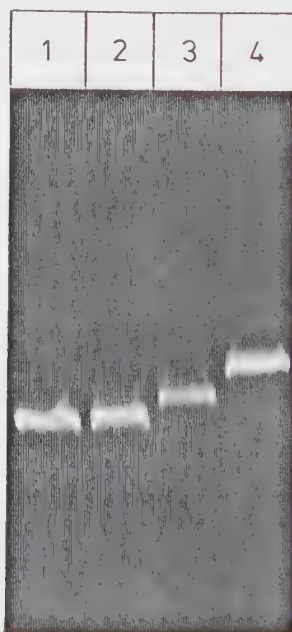


Abb. 16 Agarosegel-Elektrophorese (1 %) von rekombinanter M13 mp10-Einzelstrang-DNA. Die Visualisierung erfolgte mit Ethidiumbromid.

- 1: M13 mp10 ohne Insertion (500 ng)
- 2: M13 mp10 mit 0.6 kBp Insertion (500 ng) aus C1I-12
- 3: M13 mp10 mit 1.2 kBp Insertion (500 ng) aus C1I-12
- 4: M13 mp10 mit 2.8 kBp Insertion (500 ng) aus Ov. 1

D. 8. Sequenzierung von $\overline{\text{C1}}$ -Inhibitor-spezifischen cDNA-Insertionen nach der Dideoxy-Terminations-Methode

D. 8.1. Ermittlung der Orientierung der cDNA-Insertionen in M13

Ein Charakteristikum von M13 ist, daß seine sezernierte Form ausschließlich den + Strang enthält (siehe Abb. 8); dieser + Strang kann prinzipiell jeden der beiden Stränge einer doppelsträngigen Fremd-DNA beinhalten. Es mußte deshalb nach jeder Transformation überprüft werden, welcher Strang der cDNA-Insertion in die M13-DNA eingebaut war. Das Testsystem dafür war eine vereinfachte Sequenzierungsreaktion ("T-Tracking"), bei der nur mit dem ddTTP/dTTP-Mix gearbeitet wurde (C. 2.16.). Anhand des Bandenmusters auf dem Autoradiogramm konnten Klone zugeordnet werden (Abb. 17).

Die Klone der Lauflinie 2 und 4 enthalten denselben Strang der cDNA-Insertion, während der Klon in Lauflinie 3 den entsprechenden Gegenstrang beinhalten sollte (siehe Abb. 17). Im 5'-terminalen Bereich sind die Bandenmuster für alle Klone identisch; es handelte sich hier um den M13-Anteil. Deutlich erkennbar ist die Eco RI-Schnittstelle (mit * markiert); 3'-terminal von dieser Klonierungsstelle divergieren die Bandenmuster. Das Bandenmuster in Lauflinie 2 und 4 deutet auf das 3'-terminale Ende einer eukaryotischen mRNA hin (siehe C. 2.5. "Konstruktion einer cDNA-Bibliothek in λ gt11").



Abb. 17 Autoradiogramm einer Sequenzierungsreaktion zur Bestimmung der Orientierung der cDNA-Insertionen in rekombinanten M13 mp10

1: M13 mp10 ohne Insertion

2 - 4: M13 mp10 mit 0.6 kBp-Insertion aus C1I-12

*: Eco RI-Schnittstelle

D. 8.2. Sequenzierung der beiden Stränge des 1.2 kBp bzw. 0.6 kBp Fragments von C1I-12

Zur Bestimmung der cDNA-Sequenz von C1-Inhibitor wurden nach dem unter D. 7.4. beschriebenen Verfahren zunächst je zwei Klone selektiert, welche Strang und Gegenstrang des 1.2 kBp bzw. 0.6 kBp Fragments enthielten; diese Klone wurden als C1.2/3, C1.2/4, C0.6/4 und C0.6/5 bezeichnet. Zur Vorbereitung der Sequenzierungsreaktion wurden dann die jeweiligen DNA-Einzelstränge (500 ng) mit dem M13 Universal Primer (2 ng) (C. 2.16.) hybridisiert und die Sequenzierungsreaktion mit konstanten Nukleotidkonzentrationen durchgeführt (C. 2.16.). Als radioaktiver Marker diente (³⁵S)dATP(α S). Die Auftrennung der Stränge erfolgte durch Elektrophorese in denaturierenden Polyacrylamidgelen (C. 2.17.) und ihr Nachweis durch Autoradiographie (C. 2.18.).

Die Sequenzierung ergab, daß die 1.2 kBp-Insertion terminal einen für Signalpeptide typischen Bereich enthielt (Abb. 18 a), während die 0.6 kBp-Insertion einen poly(A)-Schwanz aufwies (Abb. 18 b).

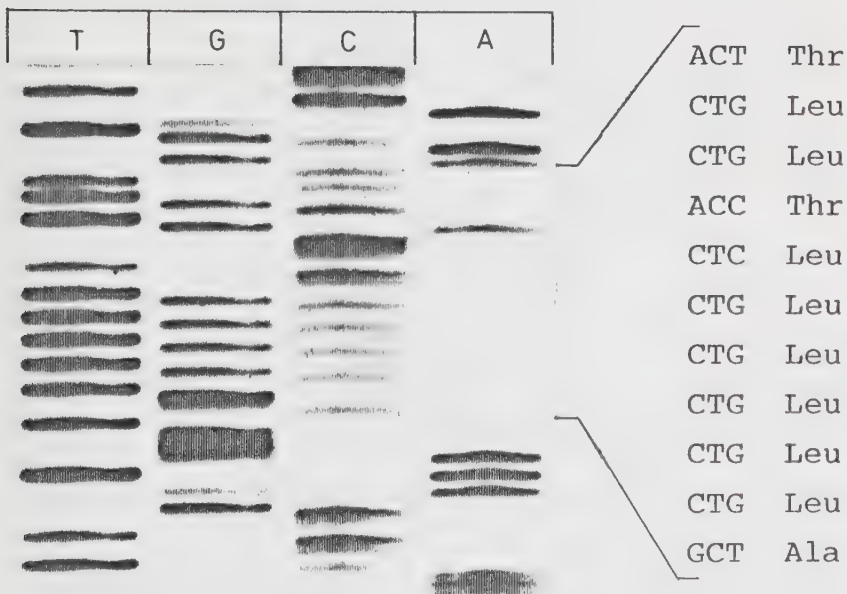


Abb. 18a: Autoradiogramm der Sequenzierungsreaktion von C1.2/3

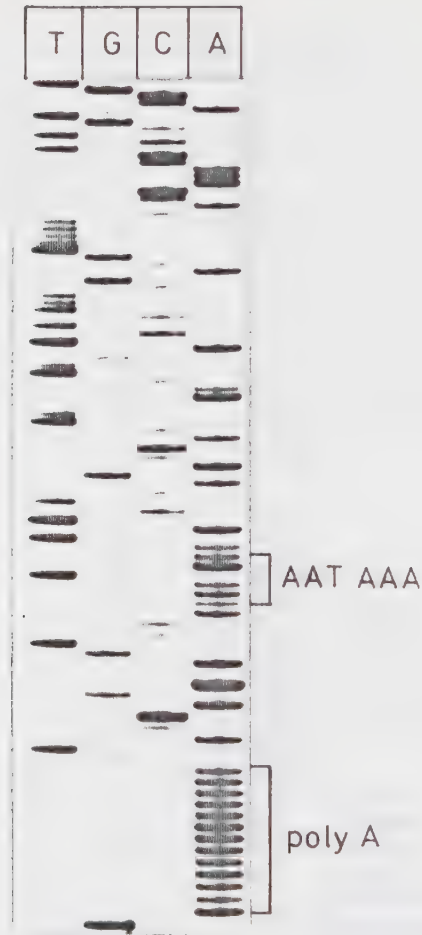


Abb. 18 b: Autoradiogramm der Sequenzierungsreaktion von Klon C0.6/4

Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß es sich bei Klon C1I-12 um eine cDNA-Insertion von 1.8 kBp Länge mit einer internen Eco RI-Schnittstelle handelt, der die (annähernd) vollständige Information für die biosynthetische Vorstufe von C1-Inhibitor trägt. Diese Annahme konnte durch die weitere Sequenzanalyse

bestätigt werden: Klon C1.2/3 kodierte für das Signalpeptid und die N-terminale Region von "reifem" C $\bar{I}$ -Inhibitor, wie sich aus Vergleich mit der bekannten Aminosäuresequenz von C $\bar{I}$ -Inhibitor ergab (Harrison et al., 1983). Dagegen enthielt Klon C0.6/4 das 3'-Ende der cDNA für C $\bar{I}$ -Inhibitor, da die Sequenz des einen Endes dieser Insertion die typischen Merkmale einer eukaryotischen mRNA zeigte, nämlich einen poly(A)-Schwanz und 15 Basen stromaufwärts das Polyadenylierungssignal AATAAA (vergl. Abb. 18). Der 5'- terminal gelegene Teil von C0.6/4 enthält einen kodierenden Bereich, der das bekannte reaktive Zentrum von C $\bar{I}$ -Inhibitor komplett beinhaltet. Von daher war nachgewiesen, daß beide Insertionen von 0.6 kBp und 1.2 kBp kodierende Sequenzen für C $\bar{I}$ -Inhibitor enthielten.

Die Aneinanderreihung der Sequenzen der beiden Klone C1.2/4 und C0.6/5 ergab erwartungsgemäß eine (interne) Eco RI-Schnittstelle. Die Sequenzen auf jeweils beiden Strängen der zwei Fragmente wurden mit Hilfe von synthetisch hergestellten Oligonukleotiden ermittelt, welche anhand von bekannten Sequenzdaten sukzessive synthetisiert wurden ("specific primer-directed sequencing", C. 2.16.) Die Sequenzierungsstrategie im einzelnen ist in Abb. 19 dargestellt.

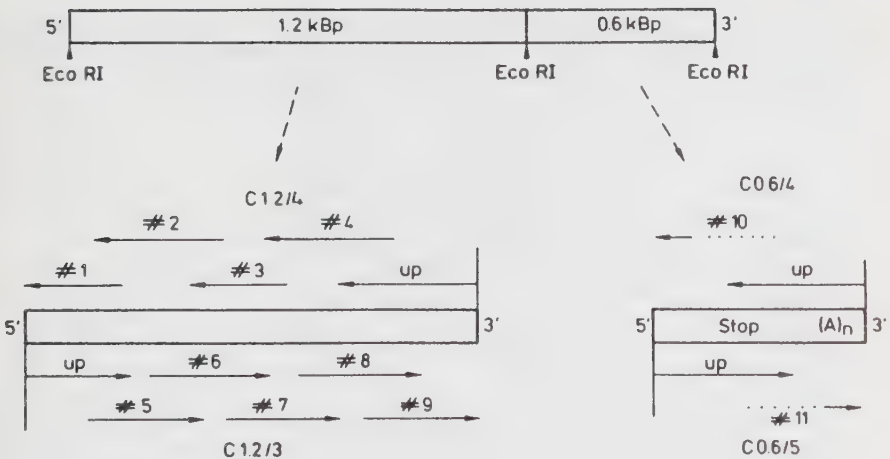


Abb. 19: Strategie für das Sequenzieren der Insertion von Klon C1I-12; die Sequenzen der mit # 1 - 11 bezifferten Primer sowie der Universalprimer (up) sind in Abb. 20 detailliert aufgeführt.

Sequenzen der für die Sequenzierung von C1I-12
benötigten spezifischen Oligonukleotide.

```
# 1: 5'- GTAACAGGTCCTGGGCAGAA - 3'
# 2: 5'- AAGAGAGGATGCTCTCCAGG - 3'
# 3: 5'- CCAGGTGTTGATGAGCTCCA - 3'
# 4: 5'- ATGGGCCACAGGGTACTTCT - 3'
# 5: 5'- GCTCCAGCTCCCAGGATCCA - 3'
# 6: 5'- ATTCGTGAACCCATCCTGG - 3'
# 7: 5'- ATTCAGCATCGCCAGCCTCC - 3'
# 8: 5'- CCTGGAGAGCATCCTCTCTT - 3'
# 9: 5'- CATTTGATCCCAAGAAAACC - 3'
# 10: 5'- TGAGGCTGGAGAGGTGCGCT - 3'
# 11: 5'- GCGATGCAGCACCAGACAGT - 3'
up: 5'- GGGTAACGCCAGGGTTTT - 3'
```

Abb. 20 Synthetisch hergestellte Oligonukleotide für die
Sequenzierung der Insertion von C1I-12

Sowohl mit dem M13 Universal-Primer als auch mit den synthetischen Oligonukleotiden (20mere) konnten durchschnittlich 250 - 350 Basen pro Sequenzierungsreaktion gelesen werden (Abb. 21).

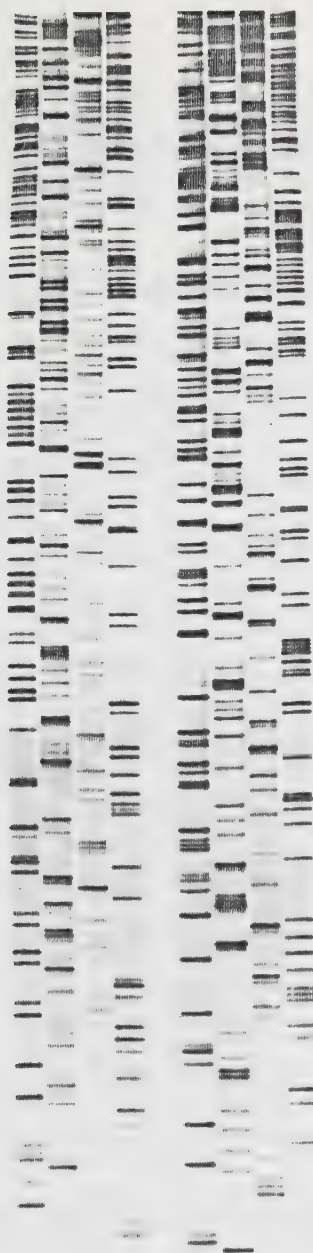


Abb. 21 Autoradiogramme von zwei Sequenzierungsreaktionen mit den synthetischen Oligonukleotiden # 5 bzw. # 7 als Primer.

Die Ermittlung der kompletten Sequenz aus Vergleich der überlappenden Fragmente erfolgte unter Zuhilfenahme des Computerprogramms Micro-Genie^R (Beckman, München). Der Sequenzvergleich der beiden Stränge ergab keine Diskrepanzen.

Die komplette Sequenz der cDNA für humanen C1-Inhibitor ist in Abb. 22 dargestellt.

Abb. 22 cDNA-Sequenz und vorausgesagte Aminosäuresequenz von humanem C1-Inhibitor

																			30																				60
CCT	CCA	GTG	CAG	ACT	CTG	CTG	ACC	CTC	CTG	CTG	CTG	CTG	GCT	GGG	GAT	AGA	GCC	TCC																					
Pro	Pro	Val	Gln	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Asp	Arg	Ala	Ser																					
-21											-10																												
										90											120																		
TCA	AAT	CCA	AAT	GCT	ACC	AGC	TCC	AGC	TCC	CAG	GAT	CCA	GAG	AGT	TTG	CAA	GAC	AGA	GGC																				
Ser	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Ser	Leu	Gln	Asp	Arg	Gly																				
-1	+1																																						
										150											180																		
GAA	GGG	AAG	GTC	GCA	ACA	ACA	GTT	ATC	TCC	AAG	ATG	CTA	TTC	GTT	GAA	CCC	ATC	CTG	GAG																				
Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ile	Ser	Lys	Met	Leu	Phe	Val	Glu	Pro	Ile	Leu	Gln																				
20																																							
										210											240																		
GTT	TCC	AGC	TTG	CCG	ACA	ACC	AAC	TCA	ACA	ACC	AAT	TCA	GCC	ACC	AAA	ATA	ACA	GCT	AAT																				
Val	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Thr	Asn	Ser	Ala	Thr	Lys	Ile	Thr	Ala	Asn	Thr	Thr	Ala	Asn																				
40																																							
										270											300																		
ACC	ACT	GAT	GAA	CCC	ACC	ACA	CAA	CCC	ACC	ACA	GAG	CCC	ACC	ACC	CAA	CCC	ACC	ATC	CAA																				
Thr	Thr	Asp	Glu	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Glu	Pro	Thr	Thr	Gln	Pro	Thr	Ile	Gln																				
60																																							
										330											360																		
CCC	ACC	CAA	CCA	ACT	ACC	CAG	CTC	CCA	ACA	GAT	TCT	CCT	ACC	CAG	CCC	ACT	ACT	GGG	TCC																				
Pro	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gln	Leu	Pro	Thr	Asp	Ser	Pro	Thr	Gln	Pro	Thr	Thr	Gly	Ser																				
80																																							
										390											420																		
TTC	TGC	CCA	GGA	CCT	GTT	ACT	CTC	TGC	TCT	GAC	TTG	GAG	AGT	CAT	TCA	ACA	GAG	GCC	GTG																				
Phe	Cys	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Glu	Ser	His	Ser	Thr	Glu	Ala	Val																				
100																																							
										450											480																		
TTG	GGG	GAT	GCT	TTG	GTG	GAT	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	TAC	CAC	GCC	TTC	TCA	GCA	ATG	AAG																				
Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Tyr	His	Ala	Phe	Ser	Ala	Met	Lys																				
120																																							
										510											540																		
AAG	GTG	GAG	ACC	AAC	ATG	GCC	TTT	TCC	CCA	TTC	AGC	ATC	GCC	AGC	CTC	CTT	ACC	CAG	GTC																				
Lys	Val	Glu	Thr	Asn	Met	Ala	Phe	Ser	Pro	Phe	Ser	Ile	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Val																				
140																																							
										570											600																		
CTG	CTC	GGG	GCT	GGG	GAG	AAC	ACC	AAA	ACA	AAC	CTG	GAG	AGC	ATC	CTC	TCT	TAC	CCC	AAG																				
Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr	Asn	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Tyr	Pro	Lys																				
160																																							
										630											660																		
GAC	TTC	ACC	TGT	GTC	CAC	CAG	GCC	CTG	AAG	GGC	TTC	ACG	ACC	AAA	GGT	GTC	ACC	TCA	GTC																				
Asp	Phe	Thr	Cys	Val	His	Gln	Ala	Leu	Lys	Gly	Phe	Thr	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Ser	Val																				
180																																							
										690											720																		
TCT	CAG	ATC	TTC	CAC	AGC	CCA	GAC	CTG	GCC	ATA	AGG	GAC	ACC	TTT	GTG	AAT	GCC	TCT	CGG																				
Ser	Gln	Ile	Phe	His	Ser	Pro	Asp	Leu	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Phe	Val	Asn	Ala	Ser	Arg																				
200																																							
										750											780																		
ACC	CTG	TAC	AGC	AGC	AGC	CCC	AGA	GTC	CTA	AGC	AAC	AAC	AGT	GAC	GCC	AAC	TTG	GAG	CTC																				
Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Asp	Ala	Asn	Leu	Glu	Leu																				
220																																							
										810											840																		
ATC	AAC	ACC	TGG	GTG	GCC	AAG	AAC	ACC	AAC	AAC	AAG	ATC	AGC	CGG	CTG	CTA	GAC	AGT	CTG																				
Ile	Asn	Thr	Trp	Val	Ala	Lys	Asn	Thr	Asn	Asn	Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Ser	Leu																				
240																																							
										870											900																		
CCC	TCC	GAT	ACC	CGC	CTT	GTC	CTC	CTC	AAT	GCT	ATC	TAC	CTG	AGT	GCC	AAG	TGG	AAG	ACA																				
Pro	Ser	Asp	Thr	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Tyr	Leu	Ser	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr																				
260																																							

Abb. 22 (Fortsetzung)

										930											960
ACA	TTT	GAT	CCC	AAG	AAA	ACC	AGA	ATG	GAA	CCC	TTT	CAC	TTC	AAA	AAC	TCA	GTT	ATA	AAA		
Thr	Phe	Asp	Pro	Lys	Lys	Thr	Arg	Met	Glu	Pro	Phe	His	Phe	Lys	Asn	Ser	Val	Ile	Lys		
280																					
										990											1020
GTG	CCC	ATG	ATG	AAT	AGC	AAG	AAG	TAC	CCT	GTG	GCC	CAT	TTC	ATT	GAC	CAA	ACT	TTG	AAA		
Val	Pro	Met	Met	Asn	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Val	Ala	His	Phe	Ile	Asp	Gln	Thr	Leu	Lys		
300																					
										1050											1080
GCC	AAG	GTG	GGG	CAG	CTG	CAG	CTC	TCC	CAC	AAT	CTG	AGT	TTG	GTG	ATC	CTG	GTA	CCC	CAG		
Ala	Lys	Val	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	His	Asn	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Pro	Gln		
320																					
										1110											1140
AAC	CTG	AAA	CAT	CGT	CTT	GAA	GAC	ATG	GAA	CAG	GCT	CTC	AGC	CCT	TCT	GTT	TTC	AAG	GCC		
Asn	Leu	Lys	His	Arg	Leu	Glu	Asp	Met	Glu	Gln	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Val	Phe	Lys	Ala		
340																					
										1170											1200
ATC	ATG	GAG	AAA	CTG	GAG	ATG	TCC	AAG	TTC	CAG	CCC	ACT	CTC	CTA	ACA	CTA	CCC	CGC	ATC		
Ile	Met	Glu	Lys	Leu	Glu	Met	Ser	Lys	Phe	Gln	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg	Ile		
360																					
										1230											1260
AAA	GTG	ACG	ACC	AGC	CAG	GAT	ATG	CTC	TCA	ATC	ATG	GAG	AAA	TTG	GAA	TTC	TTC	GAT	TTT		
Lys	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Asp	Met	Leu	Ser	Ile	Met	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	Phe	Asp	Phe		
380																					
										1290											1320
TCT	TAT	GAC	CTT	AAC	CTG	TGT	GGG	CTG	ACA	GAG	GAC	CCA	GAT	CTT	CAG	GTT	TCT	GCC	ATG		
Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Leu	Cys	Gly	Leu	Thr	Glu	Asp	Pro	Asp	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Met		
400																					
										1350											1380
CAG	CAC	CAG	ACA	GTG	CTG	GAA	CTG	ACA	GAG	ACT	GGG	GTG	GAG	GCG	GCT	GCA	GCC	TCC	GCC		
Gln	His	Gln	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Thr	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala		
420																					
										1410											1440
ATC	TCT	GTG	GCC	CGC	ACC	CTG	CTG	GTC	TTT	GAA	GTG	CAG	CAG	CCC	TTC	CTC	TTC	ATG	CTC		
Ile	Ser	Val	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Phe	Leu	Phe	Met	Leu		
440																					
										1470											1500
TGG	GAC	CAG	CAG	CAC	AAG	TTC	CCT	GTC	TTC	ATG	GGG	CGA	GTA	TAT	GAC	CCC	AGG	GCC	TGA		
Trp	Asp	Gln	Gln	His	Lys	Phe	Pro	Val	Phe	Met	Gly	Arg	Val	Tyr	Asp	Pro	Arg	Ala			
460										470											478
										1530											1560
GAC	CTG	CAG	GAT	CAG	GTT	AGG	GCG	AGC	GCT	CCA	TCT	CCA	GCC	TCA	GCT	CTC	AGT	TCG	AGC		
										1590											1620
CCT	GCT	GCT	GCC	TGC	CTG	GAC	TTG	CCC	CTG	CCA	CCT	CCT	GCC	TCA	GGT	GTC	CGC	TAT	CCA		
										1650											1680
CCA	AAA	GGG	CTC	CCT	GAG	GGT	CTG	GGC	AAG	GGA	CCT	GCT	TCT	ATT	AGC	CCT	TCT	CCA	TGG		
										1710											1740
CCC	TGC	CAT	GCT	CTC	CAA	ACC	ACT	TTT	TGC	AGC	TTT	CTC	TAG	TTC	AAG	TTC	ACC	AGA	CTC		
										1770											
TAT	AAA	TAA	AAC	CTG	ACA	GAC	CAT	GAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA		

Die Insertion von Klon C1I-12 besteht aus 1777 Bp, mit einem offenen Leserahmen von 1497 Bp und einem 3' untranslatierten Bereich von 280 Bp. Ein Stop-Codon (TGA) findet sich in Position 1498 - 1500. Die kodierende Sequenz des 5'-terminalen Bereichs der cDNA (63 Bp) besitzt die typischen Merkmale eines Signalpeptids von 21 Aminosäuren; ein hydrophober Kernbereich mit 8 Leucin-Resten in einem Abschnitt von 9 Aminosäuren wird von

Zwischen den Positionen 190 und Position 354 wird die Konsensus-Sequenz CAA CCC ACC ACC mit geringfügigen Abweichungen insgesamt 14 mal wiederholt. Auf Aminosäureebene entspricht dieser Bereich der Konsensus-Sequenz Gln - Pro - Thr - Thr; dieses repetitive Sequenzmuster könnte als Akzeptor für O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratreste fungieren (D. 10.).

Ein Hydropathie-Profil der vorhergesagten Aminosäuresequenz des C $\bar{I}$ -Inhibitors ist in Abb. 24 dargestellt.

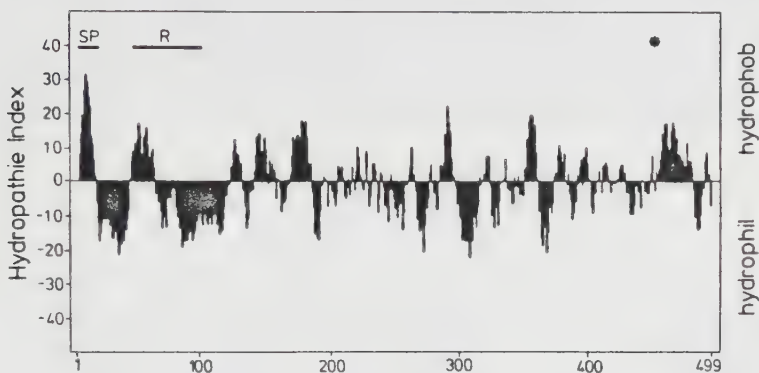


Abb. 24 Hydropathie-Profil der vorhergesagten Aminosäuresequenz des humanen C $\bar{I}$ -Inhibitors nach Kyte & Doolittle (1982). Die durchschnittliche Hydropathie wurde für fortlaufende Bereiche von neun Aminosäuren errechnet. SP: Signalpeptid; R: Repetitive Region; *: Reaktives Zentrum; Abszisse: Nummer der Aminosäuren.

D. 9. Isolierung und Charakterisierung von rekombinantem β -Galaktosidase/C $\bar{I}$ -Inhibitor-Fusionsprotein

D. 9.1. Selektion von lysogenen Bakterienzellen

Um rekombinantes C $\bar{I}$ -Inhibitor-Fusionsprotein zu gewinnen, mußten zuerst E.coli Y 1089 Zellen (lon $^{-}$, hflA 150) mit Phagen des Klon C $\bar{I}$ I-12 lysogen transformiert werden. Dazu wurden Phagen und Bakterien im Verhältnis 10 : 1 inkubiert, und anschließend Kolonien bei 32°C auf Agar gezüchtet. Lysogene Zellkolonien sind dadurch charakterisiert, daß sie bei 32°C wachsen, bei 42°C hingegen nicht (C. 2.19.). Aus ca. 50 Y 1089 Bakterien-Kolonien konnten in dieser Weise 11 lysogene Kolonien selektiert werden (20 %).

D. 9.2. Präparation von Lysaten aus lysogenen Bakterienzellen

Lysogene Bakterienzellen (Y 1089), die aus einer 30 ml Flüssig-Kultur bei 32°C gewonnen wurden (optische Dichte 578 nm = 0.5), wurden nach Induktion des β -Galaktosidase-Fusions-Proteins durch IPTG zentrifugiert (C. 2.19), in 600 μ l PBS-Puffer, pH 7.2 aufgenommen (2 % des Ausgangsvolumens) und durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die Expression von β -Galaktosidase/C $\bar{I}$ -Inhibitor-Fusionsprotein bei 37°C wurde sowohl durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Abb. 25) als auch durch Immunoprint der auf Nitrocellulose transferierten Proteine nachgewiesen (Abb. 26).

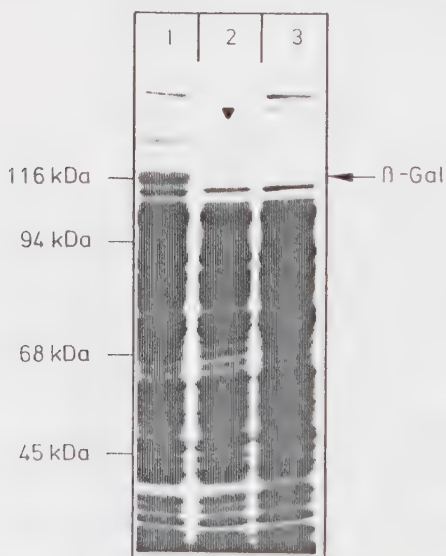


Abb. 25 SDS-Elektrophorese (Polyacrylamidgradient 10 % - 20 %) von Lysaten aus lysogenen Bakterien. Die Visualisierung erfolgte durch Silberfärbung.

MP: Markerproteine (siehe C. 1.2.)

- | | | | |
|----|--|---------|------------------------|
| 1: | E.coli Y 1089 mit λ gt11 | Wildtyp | infiziert (20 μ l) |
| 2: | E.coli Y 1089 mit λ gt11/ C $\bar{I}$ I-12 | | infiziert (20 μ l) |
| 3: | E.coli Y 1089 mit λ gt11/ Ov.1 | | infiziert (20 μ l) |

Die Lysate von lysogenen und nicht-infizierten Bakterien zeigen beide das typische Bandenmuster von E.coli. Allerdings ist bei den lysogenen Bakterien praktisch keine Bande mehr auf der Höhe der β -Galaktosidase (M_r 116 kDa) zu sehen; dafür taucht in Lauflinie 2 eine neue Bande bei ca. 150 kDa auf, die dem β -Galaktosidase-CI-Inhibitor-Fusionsprotein entspricht. Die Molekulargewichtsdifferenz von 34 kDa ist etwas weniger als die aufgrund der vorhergesagten Aminosäuresequenz erwartete von 50 kDa. Diese Diskrepanz ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß es sich bei Molekulargewichtsbestimmungen aus SDS-Elektrophoresen immer nur um apparente M_r handelt. Die Bande für das β -Galaktosidase-Ovalbumin-Fusionsprotein konnte nicht bestimmt werden.

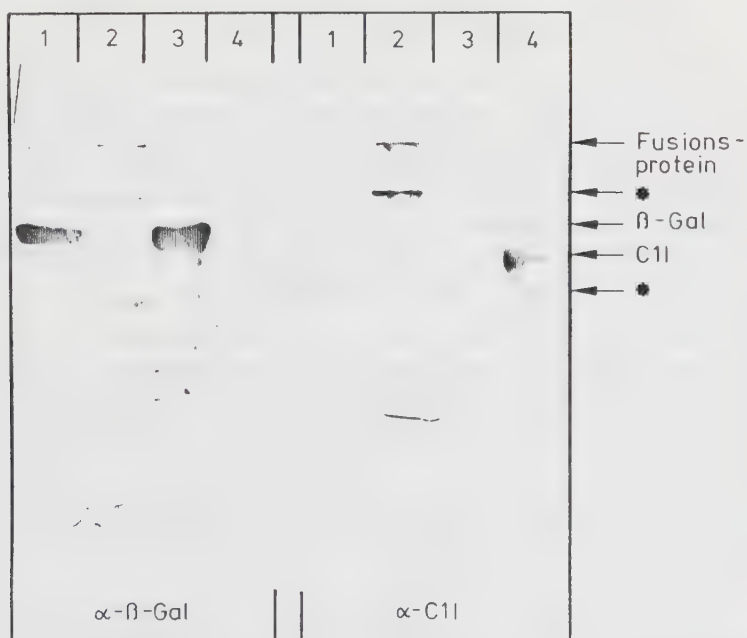


Abb. 26 Immunoprint von Lysaten lysogener Bakterien mit polyklonalen Antikörpern gegen β -Galaktosidase und humanem CI-Inhibitor.

- 1: E.coli Y 1089 mit λ gt11 Wildtyp infiziert
- 2: E.coli Y 1089 mit λ gt11/CII-12 infiziert
- 3: β -Galaktosidase (aus E.coli)
- 4: CI-Inhibitor (aus Mensch)
- *: Abbauprodukte

Anti- β -Galaktosidase-Antikörper reagierten sowohl mit gereinigter β -Galaktosidase, als auch mit dem Protein aus dem Lysat; das Fusionsprotein konnte in dem erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert werden (siehe Abb. 26). Anti-C $\bar{1}$ -Inhibitor-Antikörper reagierten nur mit dem gereinigten Inhibitor und dem β -Galaktosidase-Fusionsprotein. Weitere Banden mit kleinerem Molekulargewicht als das Fusionsprotein sind offensichtlich auf Abbauprodukte zurückzuführen (mit * markiert).

D. 10. Nachweis des hochglykosylierten Bereichs in C $\bar{1}$ -Inhibitor

D. 10.1. BrCN-Spaltung von C $\bar{1}$ -Inhibitor

Aus der vorhergesagten Aminosäuresequenz von C $\bar{1}$ -Inhibitor (D. 8.2.) geht hervor, daß das Molekül in seinem N-terminalen Bereich eine repetitive Region von ca. 56 Aminosäuren besitzt, in der insgesamt 14 x das Sequenzmotiv Gln - Pro - Thr - Thr und Variationen davon wiederholt werden. Wegen des außergewöhnlich hohen Glykosylierungsgrades von C $\bar{1}$ -Inhibitor (ca. 50 %) lag die Vermutung nahe, daß es sich bei der repetitiven Region um eine polyvalente Akzeptorstelle für O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratreste handelt.

Aufgrund der vorhergesagten Aminosäuresequenz sollte man bei der BrCN-Spaltung des C $\bar{1}$ -Inhibitors zwei größere Fragmente erwarten (15 kDa- bzw. 12 kDa-Proteinanteil) und mehrere kleinere Peptide (<5kDa-Proteinanteil). Die repetitive Region ist Teil des zweitgrößten BrCN-Bruchstücks von C $\bar{1}$ -Inhibitor mit einem vorhergesagten M_r von 13 kDa für den Proteinanteil; Glykosylierung dieses Bereichs sollte zu einer deutlichen Verschiebung des apparenten Molekulargewichts führen. Diese Hypothese wurde durch Analyse von BrCN-Fragmenten des reifen C $\bar{1}$ -Inhibitors näher analysiert.

Humaner C $\bar{1}$ -Inhibitor (15 mg) wurde mit BrCN in 70 %iger Ameisensäure gespalten, dann reduziert und die freien Thiolgruppen durch Methyljodid methyliert (C.2.20). Das Ausmaß der Spaltung wurde mittels SDS-Elektrophorese überprüft. Es zeigte sich, daß der C $\bar{1}$ -Inhibitor vollständig gespalten war, allerdings konnten selbst unter reduzierten Bedingungen keine diskreten Banden nachgewiesen werden. Ursache dafür scheint eine unspezifische Aggregation der Reaktionsprodukte zu sein. Es wurde deshalb versucht, das Fragmentgemisch über Gelfiltration unter stark denaturierenden Bedingungen zu reinigen (D. 10.2.).

D. 10.2. Isolierung der BrCN-Fragmente mittels FPLC

Ein Teil des Reaktionsgemisches (5 mg) von D. 10.1. wurde auf eine Superose-12-Säule appliziert, die mit 70 % Ameisensäure äquilibriert worden war (C. 2.21.). Die Elution erfolgte ebenfalls mit 70 % Ameisensäure und wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch verfolgt (Abb. 27).

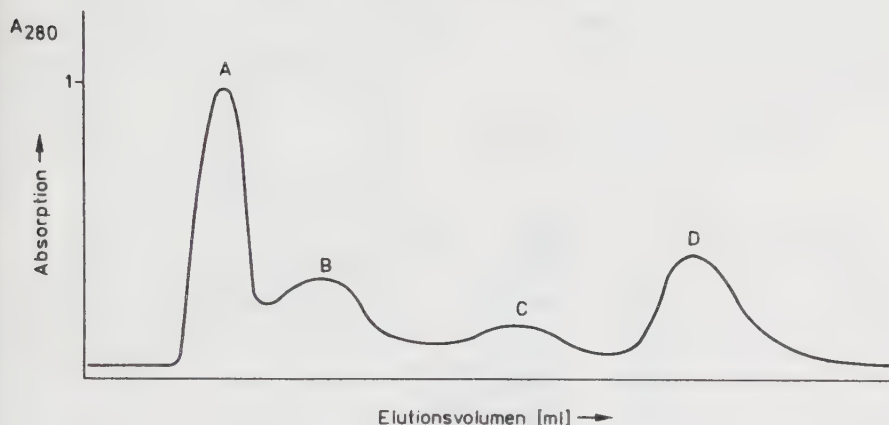


Abb. 27 Reinigung der BrCN-Fragmente aus D. 10.1 über FPLC (Absorption: willkürliche Einheiten).

Das Elutionsdiagramm (Abb. 27) zeigte vier Peaks (A - D), deren Fraktionen durch SDS-Elektrophorese analysiert wurden (Abb. 28).

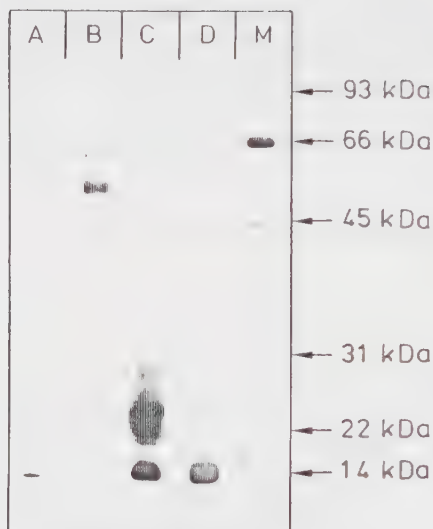


Abb. 28 SDS-Elektrophorese (Polyacrylamidgradient 10 % - 20 %) der Spitzenfraktionen der Peaks (A - D) aus D. 10.2. Die Visualisierung erfolgte durch Silberfärbung. Je Lauflinie wurden ca. 2 µg Protein appliziert. M: Markerproteine (ca. 1µg)(siehe C. 1.2.)

Peak B enthält die erwarteten Fragmente (56 kDa, 22 kDa und <10 kDa). Die anderen Peaks enthalten nicht näher charakterisierte Peptide.

D. 10.3. Enzymatische Abspaltung der N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratreste durch Endoglykosidase F

Der zentrale Teil von Peak B (siehe D. 10.2.) wurde vereinigt und mit Endoglykosidase F inkubiert (C. 2.22.). Anschließend wurden Ausgangs- und Endprodukte auf einer SDS-Elektrophorese analysiert (Abb. 29).

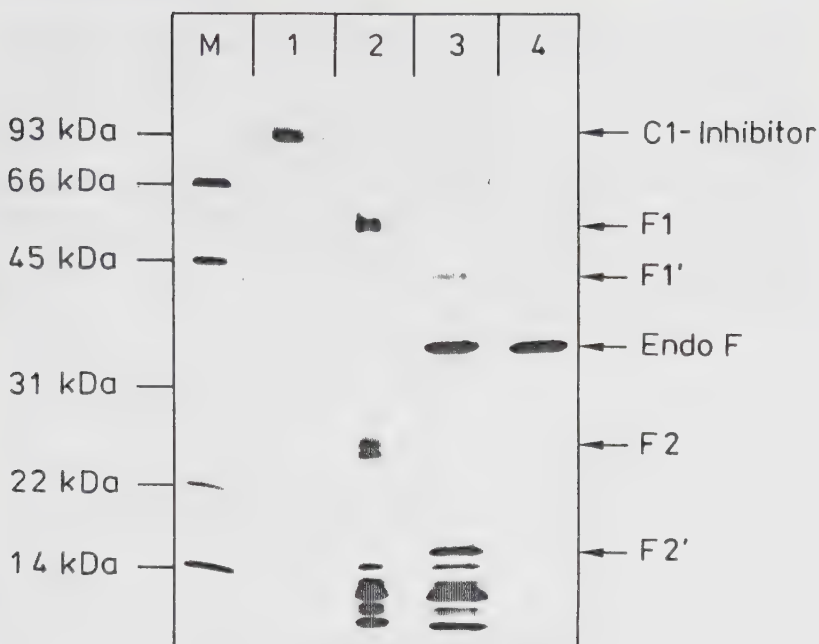


Abb. 29 SDS-Elektrophorese (Polyacrylamidgradient 10 % - 20 %) der BrCN-Fragmente vor und nach der Inkubation mit Endoglykosidase F. Die Visualisierung erfolgte durch Silberfärbung.

M: Molekulargewichtsmarker (ca. 1 µg) (siehe C. 1.2.)

1: Humaner C $\bar{1}$ -Inhibitor (2 µg)

2: Gereinigte BrCN-Fragmente des humanen C $\bar{1}$ -Inhibitors (ca. 2 µg)

3: BrCN-Fragmente des humanen C $\bar{1}$ -Inhibitors nach Inkubation mit Endoglykosidase F (ca. 2 µg)

4: Endoglykosidase F (1U)

Deutlich erkennbar ist das Verschwinden der Banden bei 56 kDa bzw. 22 kDa und das Auftreten neuer Banden bei 47 kDa und 15 kDa. Damit entspricht die 22 kDa-Bande dem größten BrCN-Fragment von

exakt 15 kDa, auf dem nur zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen nachgewiesen werden konnten.

Die 56 kDa-Bande ist dem Fragment zuzuordnen, das den repetitiven Bereich enthält (12 kDa-Proteinanteil). Da Endoglykosidase F nur N-glykosidisch gebundene Zuckerreste (sowohl vom Komplex- als auch vom "High-Mannose"-Typ) spaltet, muß das apparente Molekulargewicht des zweitgrößten Fragments von M_r 47 kDa von O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratresten herrühren (Kohlenhydratanteil des Fragment ca. 75 %). Dieser Befund steht im Einklang mit der Hypothese, daß die repetitive Sequenz Gln - Pro - Thr - Thr einen polyvalenten Rezeptor für O-glykosidische Kohlenhydratseitenketten darstellt (vergl. E. 3).

E. DISKUSSION

Molekularbiologischen Techniken kommt eine überragende Rolle zu bei der Auffindung und Charakterisierung von Genen und der daraus abgeleiteten Struktur ihrer Expressionsprodukte. Eine relativ neue Methode ist die sogenannte "Expressions-Klonierung", bei der die Suche nach bestimmten Genen über die immunologische Detektion der von ihnen kodierten Proteinanteile erfolgt. Ein besonders elegantes und mittlerweile häufig verwendetes Expressionssystem, welches von Young & Davis erstmals 1983 publiziert wurde, benützt den gentechnologisch manipulierten Phagen λ gt11 als Vektor. Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit für die Klonierung der für menschlichen C1-Inhibitor kodierenden cDNA verwendet.

E. 1. Isolierung von C1-Inhibitor-spezifischer cDNA

Die immunologische Testung von 2×10^5 Rekombinanten aus einer amplifizierten λ gt11 cDNA-Bibliothek aus humaner Leber mit polyklonalen Antikörpern gegen C1-Inhibitor ergab 107 positive Signale. Dies entspricht ca. 0.05 % der Gesamtzahl an Rekombinanten; da theoretisch nur jeder sechste Klon eine cDNA-Insertion im "richtigen" Leseraster eingebaut hat, kodieren somit ca. 0.3 % der menschlichen Leber-mRNA für C1-Inhibitor. Geht man von der Annahme aus, daß die Mehrheit der Plasma-Proteine von der Leber synthetisiert werden, so entspricht die Plasmakonzentration von C1-Inhibitor (ca. 250 mg/l) ca. 0.35 % des Gesamtplasma-Proteins (ca. 70 g/l); dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit dem grob abgeschätzten Anteil von C1-Inhibitor-mRNA an der gesamten Leber-mRNA von 0.3 %.

Zwölf willkürlich ausgesuchte positive Plaques wurden bis zur Klonalität gereinigt (C1I-1 bis C1I-12) und dann sowohl mit einem Gemisch aus sieben monoklonalen Antikörpern als auch polyklonalen Antikörpern gegen C1-Inhibitor getestet. Es zeigte sich, daß zwar alle Klone mit den polyklonalen, aber nur einer (C1I-12) mit den monoklonalen Antikörpern reagierte. Wie sich später herausstellte (siehe D. 8.2.) enthält Klon C1I-12 als einziger praktisch die gesamte Information für C1-Inhibitor. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der poly- bzw. monoklonalen Antikörper sollte in den Eigentümlichkeiten dieser beiden Antikörper-Arten zu suchen sein. Polyklonale Antikörper gegen ein Antigen beinhalten eine enorme Bandbreite, und zwar sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch der Affinität der Antikörper. Monoklonale Antikörper dagegen sind eine einheitliche Spezies, die mit einer bestimmten Affinität an eine ein-

zige antigene Determinante binden. Offensichtlich sind die verwendeten monoklonalen Antikörper vor allem gegen konformationelle Determinanten gerichtet, die nur in einem Fusionsprotein mit dem kompletten C1-Inhibitor-Protein exprimiert werden.

Für die initiale Testung einer Expressions-Bibliothek wird man deshalb in der Regel polyklonale Antikörper verwenden. In der abschließenden Testrunde ist die positive Reaktion eines Klons mit einem monoklonalen Antikörper als starkes Kriterium für eine gesuchte cDNA zu werten; eine negative Reaktion darf allerdings aus oben genannten Erwägungen nicht als Ausschlusskriterium verstanden werden.

Von den genannten zwölf Klonen hatte C1I-12 die längste Insertion von 1.8 kBp. Diese cDNA wies eine interne Eco RI-Schnittstelle auf, so daß bei Inkubation von Phagen-DNA mit dem Restriktionsenzym zwei Fragmente von 1.2 kBp bzw. 0.6 kBp freigesetzt wurden. Da cDNA-Fragmente bei der Konstruktion einer cDNA-Bibliothek im Phagen λ gt11 in eine singuläre Eco RI-Schnittstelle inseriert werden (Abb. 6), müssen die für die Vermehrung des Phagen verwendeten E.coli-Wirtsstämme einen Genotyp besitzen, der entsprechende Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen nicht modifiziert (methyliert) und damit für das gewünschte Enzym zugänglich läßt. Damit werden auch interne Eco RI-Schnittstellen, die bei der Konstruktion der cDNA-Bank durch Methylierung geschützt sind, für die Restriktionsnuklease zugänglich. Die immunologische Testung der cDNA-Bibliothek und die Präparation der Phagen-DNA erfolgte deshalb in E.coli Y 1090, einem sowohl restriktions- als auch modifikations-negativen Stamm (r^- , m^-). Die Amplifizierung der cDNA-Bibliothek wurde dagegen in dem Bakterienstamm E.coli Y 1088 durchgeführt, der restriktions-negativ und modifikations-positiv war (r^- , m^+); dies sollte gewährleisten, daß keine DNA-Anteile durch das wirtseigene Abwehrsystem verloren gehen.

Die cDNA-Insertionen von Klon C1I-12 wurden nach der enzymatischen Didesoxy-Terminations-Methode sequenziert. Die für dieses Verfahren benötigte Einzelstrang-DNA wurde mit dem Phagen M13 gewonnen (Abb. 8). Die isolierten und gereinigten cDNA-Fragmente (1.2 kBp bzw. 0.6 kBp) wurden zuerst mit dem linearisierten Vektor M13 mp10 ligiert und damit kompetente E.coli JM 103-Zellen transformiert. Da die Ligierungskontrollen (M13/ Eco RI bzw. M13/ Eco RI + T4-Ligase) ca. 200 Plaques/1 ng Vektor-DNA ergaben und damit im erwarteten Bereich lagen, sollten die vergleichsweise schlechten Ausbeuten an rekombinanten M13-Phagen im wesentlichen auf zwei Faktoren zurückzuführen sein (siehe D. 7.). Die eingesetzten cDNA-Insertionsmengen konnten nur anhand der Bandenintensität in der Agarosegel-Elektro-

phorese abgeschätzt werden; dadurch wurde offensichtlich das vorgegebene Vektor/cDNA Verhältnis von 1 : 5 (w/w) nicht eingehalten und die anschließende Ligierung führte dadurch zu einem übermäßig hohen Anteil an Religation des Vektors M13 (blaue Plaques/weiße Plaques = 20 : 1 anstatt 1 : 3). Für die Transformationsraten, die um den Faktor 3 - 4 unter den erwarteten Ausbeuten lagen, könnten die kompetenten Zellen verantwortlich sein. Zwar wurden die kompetenten Zellen nach der CaCl_2 -Methode für jeden Transformationsversuch neu hergestellt; jedoch ist wegen Vielzahl der Parameter, die die Transformationseffizienz beeinflussen (Hanahan, 1983), offenbar kein optimales Ergebnis erzielt worden.

E. 2. Sequenzierung der cDNA von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor

Die cDNA-Insertionen von Klon $\text{C}\bar{\text{I}}$ I-12 wurden mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide (20mere) auf beiden Strängen aufgeklärt ("specific primer-directed sequencing"). Diese neuartige Technik erlaubt ein rasches Vorgehen bei der schrittweisen Sequenzierung eines DNA-Strangs in der 3' - 5'-Richtung (des M13 + Strangs). Von den insgesamt elf Oligonukleotiden, die ohne weitere Aufreinigung verwendet wurden, lieferten neun ähnlich gute Ergebnisse wie der kommerziell erwerbbarer Universal Primer für M13 (18mer). Zwei Oligonukleotide, die komplementär zum 3'- terminalen Bereich des Klons waren, zeigten auch unter veränderten Temperaturbedingungen keine Hybridisierung mit dem parentalen DNA-Strang. Pro spezifischem Primer konnten ca. 200 - 300 Bp sequenziert werden. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit den Werten von Strauss et al. (1986), die fanden, daß Oligonukleotide mit mehr als 12 Basen ohne Nachreinigung als Primer für die DNA-Sequenzierung verwendet werden können.

Die Computeranalyse überlappender Sequenzen zeigte schließlich, daß Klon $\text{C}\bar{\text{I}}$ I-12 praktisch die vollständige cDNA für $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor enthält; lediglich das für das Initiationsmethionin kodierende Codon ATG am extremen 5'- terminalen Ende fehlte. Die Insertion ist 1777 Bp lang; davon kodieren die 5'-terminalen 1497 Bp für den reifen $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor (478 Aminosäuren), einschließlich eines Signalpeptids (21 Aminosäuren). In den Positionen 1246 - 1251 fand sich eine Erkennungssequenz GAATTC für das Restriktionsenzym Eco RI. Der 3'- untranslatierte Bereich war 280 Bp lang, mit einem einzigen Polyadenylierungssignal AATAAA 15 Bp stromaufwärts vom poly(A)-Schwanz, der aus 12 Adenylresten bestand. Die Anwesenheit eines Klons mit der gesamten cDNA für $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor bestätigte die Qualität der verwendeten cDNA-Bibliothek (Kwok et al., 1985), die im Arbeitskreis von

S. Woo hergestellt worden war. So konnten bereits die kompletten cDNAs für die in der Leber synthetisierten Proteine LMW-Kininogen (Ohkubo et al., 1984), Phenylalanin-Hydroxylase (Kwok et al., 1985) und Alkohol-Dehydrogenase (Ikuta et al., 1985) erfolgreich aus dieser Bibliothek isoliert werden.

Aufgrund der (-3, -1)-Regel (von Heijne, 1986) konnte die Schnittstelle für die Signalpeptidase vorhergesagt werden. Typischerweise sind die Aminosäuren in Position - 3 nicht aromatisch (Phe, His, Tyr, Trp), geladen (Asp, Glu, Lys, Arg) oder groß und polar (Asn, Gln); die Aminosäuren in Position - 1 müssen klein sein (Ala, Ser, Gly, Cys, Thr, Gln). Im Falle des C1-Inhibitors befindet sich in Position - 3 ein Alanin und in Position - 1 ein Serin; damit liegt die vorausgesagte Schnittstelle zwischen Serin und Asparagin, was in guter Übereinstimmung mit der von Harrison (1983) publizierten aminoterminalen Aminosäure von reifem C1-Inhibitor (Asparagin) ist. Das aufgrund der cDNA-Sequenz vorausgesagte Signalpeptid enthielt einen extrem hydrophoben Kernbereich mit 8 Leucylresten in einem Segment von 9 Aminosäuren. Dagegen weist das Signalpeptid im N-terminalen Teil eine polare Gruppe (Gln, Thr) und im C-terminalen Teil zwei geladene Aminosäuren (Asp, Arg) auf. Die vorausgesagte Aminosäuresequenz von Klon C1I-12 trägt keinen N-terminalen Methioninrest, wie es für eukaryotische Prä-Proteine typisch ist; damit lag die Vermutung nahe, daß Klon C1I-12 Teile des 5'-terminalen Bereichs fehlten (siehe D. 8.2.). Andere potentielle Schnittstellen für Signalpeptidasen wurden nach den Kriterien der (-3, -1)-Regel nicht gefunden.

Der 3'-untranslatierte Bereich lag mit einer Länge von 280 Bp in einem typischen Bereich, wenn man die bei menschlichem Blutgerinnungsfaktor X gefundene Länge von 10 Bp (Fung et al., 1985) oder die 1286 Bp bei menschlichem HMW-Kininogen (Takagaki et al., 1985) als Extremata annimmt. Im Gegensatz zu den 3'-untranslatierten Bereichen von Alkohol-Dehydrogenase (Ikuta et al., 1985) und Phenylalanin-Hydroxylase (Kwok et al., 1985), die beide jeweils drei Polyadenylierungssignale (AATAAA) aufwiesen, beinhaltete die cDNA-Sequenz von C1-Inhibitor nur eine kanonische Hexanukleotid-Box, die in typischer Position 15 Bp stromaufwärts vom poly(A)-Schwanz lag (Proudfoot & Brownlee, 1976).

Kurz vor Abschluß der eigenen Sequenzierungsarbeiten (September 1986) erschienen in kurzer Folge vier Publikationen über die Sequenzierung von C1-Inhibitor spezifischer cDNA, von denen aber nur Bock et al. (1986) die vollständige Sequenz beschrieben. Tosi et al. (1986) publizierten ebenso wie Que & Petra (1986) lediglich den 3'-terminalen Bereich der cDNA-Sequenz mit den Positionen 633 - 1719 bzw. Positionen 554 bis 1777 (die Nu-

Neben den Differenzen im 5'- terminalen Bereich wurden zwei Polymorphismen im kodierenden Bereich gefunden. So verändert der C - G - Austausch in Position 556 ein Codon für Glutamin (CAG) zu einem Codon für Glutaminsäure (GAG). Die zweite Mutation verändert ein Codon für Valin (GTG) zu einem Codon für Methionin (ATG) (Position 1435); dieser Polymorphismus wurde bereits von Bock et al. selbst gefunden. Im 3'- untranslatierten Bereich unterschieden sich beide cDNA-Sequenzen in vier Positionen. So wurde in den Positionen 1556-1557 ein GC / CG - Austausch gefunden (Inversion), in Position 1592 eine Mutation von A nach C, in Position 1632 die Insertion eines Cytosins und unmittelbar vor dem poly(A)-Schwanz in Position 1765 eine Guanin - Insertion (Abb. 31).

1498	TGAGACCTGCAGGATCAGGTTAGGGCGAGCGCTACCTCTCCAGCCTCAGCTCTCAGTTG
1536	TGAGACCTGCAGGATCAGGTTAGGGCGAGCGCTACCTCTCCAGCCTCAGCTCTCAGTTG
1558	AGCCCTGCTGCTGCCTGCCTGGACTTGCCCTGCACTCTGCCTCAGGTGTCGGCTAT
1596	AGCCCTGCTGCTGCCTGCCTGGACTTGCCCTGCACTCTGCCTCAGGTGTCGGCTAT
1618	CCACCAAAAGGGCTCCTGAGGGTCTGGGCAAGGGACCTGCTTCTATTAGCCCTTCTCCA
1656	CCACCAAAAGGGCTCCTGAGGGTCTGGGCAAGGGACCTGCTTCTATTAGCCCTTCTCCA
1678	TGGCCCTGCCATGCTCTCCAAACCACTTTTTCAGCTTTCTCTAGTTCAAGTTCACCAGA
1715	TGGCCCTGCCATGCTCTCCAAACCACTTTTTCAGCTTTCTCTAGTTCAAGTTCACCAGA
1738	CTCTATAAATAAAACCTGACAGACCATGAAAAAAAAAAAA
1775	CTCTATAAATAAAACCTGACAGACCATGAAAAAAAAAAAA

Abb. 31 Vergleich des 3'- untranslatierten Bereichs der cDNA der Klone C1I-12 (obere Zeile) und λ 4r (untere Zeile)

Die Sequenz von Tosi et al. (1986) war im kodierenden Bereich, bis auf den genannten Polymorphismus in Position 1435,

identisch mit der hier vorgelegten Sequenz. Im 3'- untranslatierten Bereich wurden Unterschiede in den Positionen 1555-1556 gefunden (GC/CG-Austausch) und in Position 1584 (Insertion von G).

Im Vergleich mit der Sequenz von Que & Petra (1986) zeigten sich zwei Unterschiede: so divergieren die Sequenzen am 5'-terminalen Ende der Sequenz von Que & Petra in zwei Positionen (Position 558, A statt G und Position 561, C statt G) von der vorliegenden Sequenz, während die zwölf Basen unmittelbar 3'-terminal von der internen Eco RI-Schnittstelle in der Sequenz von Que & Petra vollständig deletiert waren.

Die größten Unterschiede wurden beim Vergleich mit der von Davis et al. (1986) publizierten Sequenz festgestellt. So war in den Positionen 786 - 788 ein komplettes Codon in der Sequenz von Davis deletiert, während in den Positionen 939 bzw. 961 und den Positionen 1106 bzw. 1122 der Leserahmen durch Deletion bzw. Insertion in der Sequenz von Davis et al. verschoben wurde. In Position 1176 wurde eine Mutation (C nach A) gefunden; eine Eco RI-Erkennungssequenz (GAATTC, Positionen 1246 - 1251) wurde von Davis et al. nicht gefunden, statt dessen berichten sie die Sequenz GTTTTC in diesen Positionen. Im 3'- untranslatierten Bereich schließlich fanden sich noch zwei Unterschiede: in den Positionen 1313-1314 eine Inversion (CT nach TC) und in Position eine Mutation (G nach C).

E. 3. Proteinchemische Daten von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor

Aus der cDNA-Sequenz von Klon C1I-12 konnte die praktisch vollständige Aminosäuresequenz der biosynthetischen Vorstufe von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor vorhergesagt werden (bis auf das Initiationsmethionin in Position - 22). $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor wird demzufolge als Prä-Inhibitor in menschlichen Hepatocyten synthetisiert. Aller Voraussicht nach wird cotranslational das für sekretorische Proteine obligate Signalpeptid (mindestens 21 Aminosäuren) abgespalten (Blobel & Dobberstein, 1975). Der im menschlichen Plasma zirkulierende reife $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor besteht demnach aus 478 Aminosäuren, mit Asparagin als N-terminale und Alanin als C-terminale Aminosäure. Die von Salvesen et al. (1985) aufgeklärten Aminosäuren des reaktiven Zentrums des $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitors, Arginin bzw. Threonin, sind in Position 444 bzw. 445 lokalisiert. Ein besonderes Merkmal der Primärstruktur von $\text{C}\bar{\text{I}}$ -Inhibitor ist ein Bereich am aminoterminalen Ende des Hemmstoffs. So wird die Konsensus-Sequenz Gln - Pro - Thr - Thr und Varianten davon zwischen den Positionen 43 und 97 insgesamt vierzehnmal wiederholt (Abb. 32).

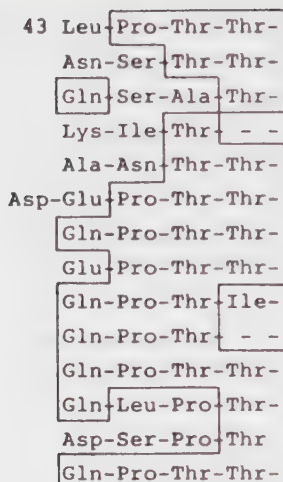


Abb. 32 Repetitiver Bereich in der vorhergesagten Aminosäuresequenz von humanem Cl^- -Inhibitor

Ein Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit der von Harrison (1983) publizierten N-terminalen Sequenz des Cl^- -Inhibitors ergab keinerlei Unterschiede; die von Salvesen et al. (1985) veröffentlichte Aminosäuresequenz im reaktiven Zentrum des Inhibitors konnte ebenfalls bestätigt werden.

Aus der vorhergesagten Aminosäuresequenz von Cl^- -Inhibitor errechnete sich ein Molekulargewicht von 52870 Da bezogen auf den Proteinanteil. Aufgrund des apparenten Molekulargewichts des Cl^- -Inhibitors von 104 kDa in der SDS-Elektrophorese und der von Harrison (1983) publizierten Kohlenhydrat-Zusammensetzung sollte Cl^- -Inhibitor einen hohen Anteil O-glykosidisch gebundener Kohlenhydratseitenketten aufweisen, zumal nur fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen des Typs Asn - X - Thr (Ser) in der vorhergesagten Aminosäuresequenz gefunden werden konnten. Potentielle O-Glykosylierungsstellen sind die Threonine der repetitiven Sequenz Gln - Pro - Thr - Thr (siehe D. 8.2.); so sind beispielsweise in der von Kellermann et al. (1986) veröffentlichten Aminosäuresequenz des HMW-Kininogens Variationen dieser Konsensus-Sequenz, nämlich Asn - Pro - Thr^{*} - Thr, Glu - Glu - Thr - Thr^(*) und Asp - Ser - Thr - Thr^(*), gefunden worden, in

denen jeweils ein Threonin (*) einen O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratrest trägt.

Ein indirekter Beweis für die ungewöhnliche posttranslationale Modifizierung des C $\bar{I}$ -Inhibitors im Bereich der repetitiven Sequenz gelang durch die Inkubation von BrCN-Fragmenten des reifen C $\bar{I}$ -Inhibitors mit dem Enzym Endoglykosidase F (Abb. 33).

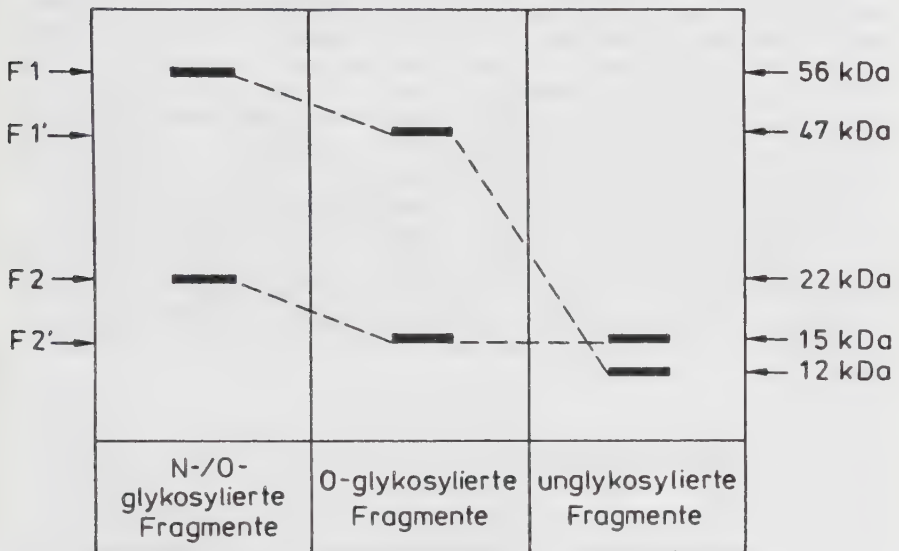


Abb. 33 Schematische Darstellung der beiden größten BrCN-Fragmente von C $\bar{I}$ -Inhibitor vor bzw. nach der Deglykosylierung. Die anderen Fragmente (alle < 10 kDa) sind nicht berücksichtigt.

F1: Position 32 - 138 = 107 Aminosäuren (ca. 12 kDa)

F2: Position 146 - 288 = 143 Aminosäuren (ca. 15 kDa)

Da aufgrund der vorhergesagten Aminosäuresequenz die Länge der BrCN-Fragmente hinsichtlich des Proteinanteils genau bekannt war, und andererseits Endoglykosidase F nur N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratreste vom Komplex- und "High-Mannose"-Typ spaltet, mußte die resultierende apparente Molekulargewichtsdifferenz der Endoglykosidase F behandelten BrCN-Fragmente von O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratseitenketten herrühren.

Die Analyse der BrCN-Fragmente mittels SDS-Elektrophorese vor

bzw. nach der Inkubation mit Endoglykosidase F bestätigte diese Vermutung. Fragment F1 (Positionen 32 bis 138 des reifen C1-Inhibitors, entsprechend einem Proteinanteil von 12 kDa), das die komplette repetitive Region umfaßt, veränderte sein Laufverhalten nur geringfügig (56 kDa nach 47 kDa) durch Entfernung von (vermutlich) zwei N-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratresten. Dagegen ging Fragment F2 (Positionen 146 - 288 des reifen C1-Inhibitors) auf sein "wahres" Molekulargewicht von 15 kDa zurück. Das apparente Molekulargewicht von Fragment F1, das den repetitiven Bereich enthält, lag damit immer noch um den Faktor 4 höher als das exakte Molekulargewicht des Proteinanteils von 12 kDa. Diese enorme Diskrepanz in den erwarteten und gefundenen Molekulargewichten dürfte auf O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratseitenketten zurückzuführen sein ; die Zahl der Seitenketten kann grob auf 11 - 12 abgeschätzt werden.

Einen direkten Beweis lieferte die Gruppe von Magnusson (Bock et al., 1986), die die Aminosäuresequenz des C1-Inhibitors partiell aufklärten. Sie konnten zeigen, daß zumindest drei der vierzehn Repetitionen einen O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydratrest enthalten; darüber hinaus konnten sie wahrscheinlich machen, daß auch noch elf weitere Threonin-Reste O-glykosyliert sind.

E. 4. Homologieuntersuchungen mit anderen Proteinen

Die Untersuchung der vorhergesagten Aminosäuresequenz von C1-Inhibitor auf Homologie mit anderen bekannten Proteinsequenzen zeigte eindeutig, daß C1-Inhibitor ein Mitglied der Superfamilie der Serin-Proteinasen-Inhibitoren "Serpine" ist (Abb. 34).

Es zeigte sich jedoch, daß die Homologie nur auf den C-terminalen Bereich (Positionen 98 - 478 des reifen Proteins) beschränkt ist, während die N-terminale Region (1 - 97 des reifen Proteins) spezifisch für C1-Inhibitor ist; eine vergleichbare Sequenz konnte bisher noch bei keinem anderen Protein gefunden werden. Der C1-Inhibitor ist somit der erste Vertreter einer neuen Sub-Klasse von Serpinen. Im Bereich des reaktiven Zentrums (*) (siehe Abb. 34) finden sich keine Homologien mit anderen Serpinen, was auf die Hypervariabilität der Aminosäuresequenz im reaktiven Zentrum hinweist; dagegen sind die, das reaktive Zentrum, flankierenden Regionen konserviert. Dieser Befund steht im krassen Gegensatz zur extremen Konservierung des aktiven Zentrums von Serin-Proteinasen, wo durch geringfügige Variationen in der Aminosäuresequenz veränderte Substratspezifitäten erzielt werden.

```

394 L E F F D F S Y D L N L C G L T E D P D - - L O V S A M Q H Q T V L E
307 G I T K V F S N G A D L S G V T E E A P - - L K L S K A V H K A V L T
308 G I E E A F T S K A D L S G I T G A R N - - L A V S Q V V H K V V S D
370 G V D L F S P E K S K L P G I V A E G R D D L Y V S D A F H K A F L E
(370) G I R M L F D K N G M A G I S D Q R - - I A I D L F K H Q G T I T
129 G I K E V F T E Q A D L S G I I E T K K - - L S V S Q V V H K A V L D
367 E L P A I L H T E L N L Q K L S N D R - - I R V G E V L N S I F F E
301 G I T D V F S S S A N L S G I S S A E S - - L K I S Q A V H A A H A E
(86) G L Q L P F S E E A D L S E M V D S S Q G - L E I S H V F H K S F V E

```

```

*
L T E T G V E A A A A - - S A I S V A R T L L V F E V - - - - Q Q P
I D E K G T E A A G A M - F L E A I P M S I P P E V K F - - - N K P
V F E E G T E A S A A T - A V K I T L L S A L V E T R T I V R F N R P
V N E E G S E A A A S T - A V V I A G R S L N P N R V T F K A - N R P
V N E E G T Q A T T V T - T V G F M P L S T Q V R F T V - - - D R P
V A E T G T E A A A A T G V I G G I R R A I L P A V H F - - - N R P
L - E A D E R E P T E S T Q Q L N K P E V L E V T L - - - - N R P
I N E A G R E V V G S A E A G V D A A S V S E E F R A - - - - D H P
V N E E G T E A G A A T V A M G V A M S M P L K V D L V D F Y A N H P

```

```

F L F M L W D Q Q H K F P V F M G R V Y D P R A - - - - -
F V F L M I E Q N T K S P L F M G K V V N P T Q K - - - - -
F L M I I V P T D T Q N I F F M S K V T N P S K P R A C I K Q W G S Q
F L V F I R E V P L N T I I F M G R V A N P C V K - - - - -
F L F L I Y E H R T S C L L F M G R V A N P S R S - - - - -
F L F V I Y H T S A Q S I L F M A K V N N P K - - - - -
F L F A V Y D Q S A T A L H F L G R V A N P L S T A - - - - -
F L F C I K H I A T N A V L F F G R C V S P - - - - -
F L F L I R E D I A G V V V F V G H V T N P L I S A - - - - -

```

Abb. 34 Vergleich der C-terminalen Sequenzen von Mitgliedern der Superfamilie der Serin-Proteinasen-Inhibitoren: C_i-Inhibitor (Mensch)(Positionen 394 - 478 des reifen Proteins); α_1 -Antitrypsin (Mensch); α_1 -Antichymotrypsin (Mensch); Antithrombin III (Mensch); Heparin Cofaktor II (Mensch); Contrapsin (Maus); Angiotensinogen (Mensch); Ovalbumin; Protein 2 (Gerste).

* : Reaktives Zentrum der Serpine.

Die Proteine sind nach maximaler Homologie, zum Teil unter Einfügung von Leerstellen, angeordnet.

Ein hypothetisches Evolutionsschema für die drei Subklassen der Serpine ist in Abb. 35 dargestellt. Dieses Schema basiert auf Berechnungen von Pearson & Lipman (1985)(Tab. 2).

Protein	Überlappungsbereich (Anzahl der Aminosäuren)	Homologie (%)
Protein X (Huhn)	223	29.1
α_1 -Antichymotrypsin (Mensch)	377	26.8
Antithrombin III (Mensch)	335	25.4
α_1 -Antitrypsin (Pavian)	381	26.0
α_1 -Antitrypsin (Mensch)	382	27.0
Protein Y (Huhn)	294	26.5
Speichelprotein (Fruchtfliege)	103	25.2
Ovalbumin	287	25.8
Angiotensinogen (Mensch)	285	22.5
Angiotensinogen (Ratte)	287	22.3

Tab. 2 Homologieuntersuchungen von C1⁻-Inhibitor mit Mitgliedern der Superfamilie der Serin-Proteinasen-Inhibitoren (Die Homologie gibt die Prozentzahl von Aminosäuren in identischen Positionen wieder)

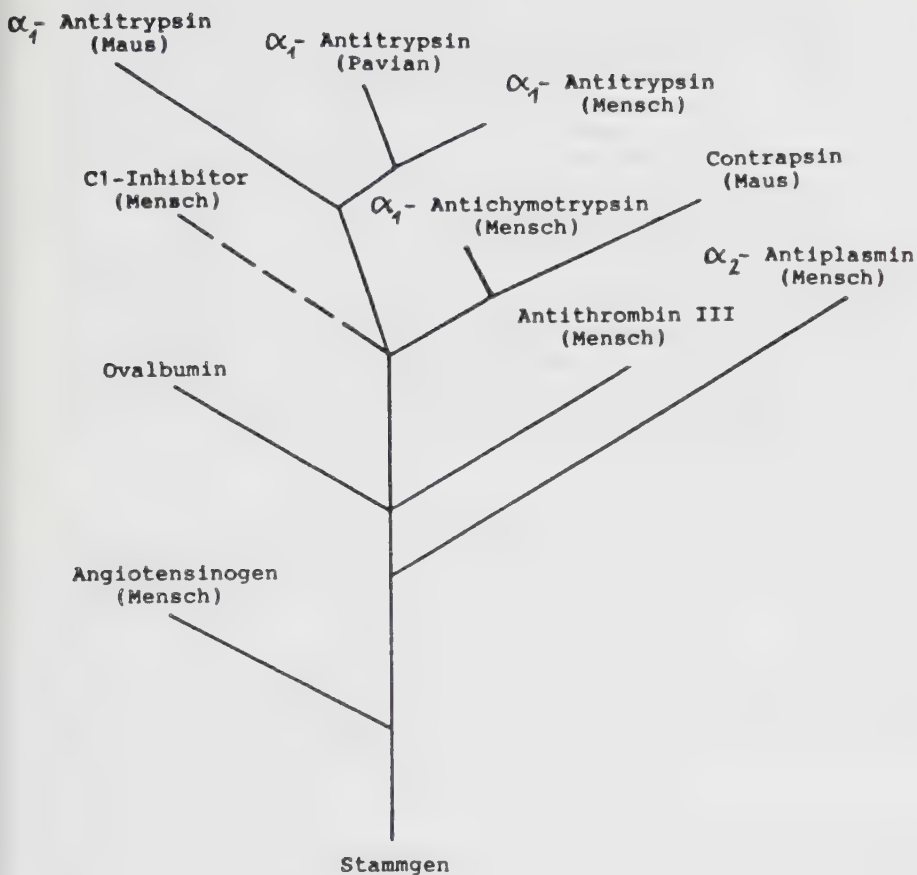


Abb. 35 Hypothetisches Evolutionsschema für die Serpine (entnommen von Carrell & Boswell, 1986 ; die Abzweigung des C1-Inhibitor-Gens wurde aufgrund der im Homologieprogramm berechneten Verwandtschaft festgelegt).

E. 5. Ausblick

Im Hinblick auf ein näheres Verständnis sowohl der physiologischen als auch pathophysiologischen Wirkungsweise von $C\bar{I}$ -Inhibitor ergeben sich durch die bekannte cDNA-Sequenz interessante Perspektiven. So sollte versucht werden, sowohl die gesamte cDNA, als auch Teile davon (z.B. die Serpin-Domäne) in pro- und eukaryotischen Systemen zur Expression zu bringen; dadurch könnte der Einfluß einzelner Domänen bzw. der Effekt der Glykosylierung auf die biologische Aktivität des Inhibitors untersucht werden. Aufgrund der Polymorphismen im $C\bar{I}$ -Inhibitor-Gen sollte es möglich sein, Restriktionsenzym-Kartierungen von DNA ("restriction fragment length polymorphism") aus verschiedenen Individuen als Methode zur gezielten Suche nach den molekularen Ursachen der $C\bar{I}$ -Inhibitor-Defizienz näher zu analysieren. Weiterhin dürfte auch die Aufklärung der genomischen Organisation von $C\bar{I}$ -Inhibitor von Bedeutung sein; denkbar wäre, daß die auf Aminosäureebene beobachtete Domänenstruktur (repetitive Domäne, Serpin-Domäne) durch Exon/Intron-Organisation ihre Entsprechung findet.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Anonym: M13 cloning and sequencing handbook (Fa. Amersham)

Bensa, J.C., Reboul, A. & Colomb, M.G. (1983) Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1-inhibitor by resting and stimulated human monocytes. *Biochem. J.* 216, 385 - 392

Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. *J. Cell Biol.* 67, 835 - 851

Bock, S.C., Skriver, K., Nielson, E., Thørgersen, H.-C., Wiman, B., Donaldson, V.H., Eddy, R.L., Marrinan, J., Radziejewska, E., Huber, R., Shows, T.B. & Magnusson, S. (1986) Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 25, 4292 - 4301

Carrell, R.W. & Travis, J. (1985) α_1 -antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10, 20 - 24

Carrell, R.W. & Boswell, D.R. (1986) Serpins: the superfamily of plasma serine proteinase inhibitors. In: *Proteinase Inhibitors* (Barrett, A.J. & Salvesen, G., eds.), pp. 403 - 420, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Chesne, S., Villiers, C.L., Arlaud, G.J., Lacroix, M.B. & Colomb, M.G. (1982) Fluid-phase interaction of C1-Inhibitor (C1Inh) and subcomponents C1r and C1s of the first component of complement, C1. *Biochem. J.* 201, 61 - 70

Chung, D.W., Que, B.G., Rixon, M.W., Mace, M., Jr. & Davie, E.W. (1983) Characterization of complementary deoxyribonucleic acid and genomic deoxyribonucleic acid for the B chain of human fibrinogen. *Biochemistry* 22, 3244 - 3250

Cicardi, M., Bergamanschi, L., Marasini, B., Boccasini, G., Tucci, A. & Agostini, A. (1982) Hereditary angioedema: an appraisal of 104 cases. *Am. J. Med. Sci.* 284, 2 - 9

Cohen, G.N. & Holzer, H. (1979) Limited proteolysis in microorganisms (DHEW Publication No., NIH, ed.) pp. 79 -1591, US Government Printing Office, Washington D.C.

Davie, E.W., Fujikawa, K., Kurachi, K. & Kisiel, W. (1979) The role of serine proteases in blood coagulation. *Adv. Enzymol.* 48, 277 - 318

Davis III, A.E., Whitehead, A.S., Harrison, R.A., Dauphinais, A., Bruns, G.A.P., Cicardi, M. & Rosen, F.S. (1986) Human inhibitor of the first component of the complement, C1: characterization of cDNA clones and localization of the gene to chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 3161 - 3165

Donaldson, V.H. & Evans, R.R. (1963) A biochemical abnormality in hereditary angioneurotic edema: absence of serum inhibitor of C1 esterase. *Am. J. Med.* 35, 37 - 44

Donaldson, V.H., Rosen, F.S. & Bing, D.H. (1977) Role of the second component of complement (C2) in hereditary angioneurotic edema (HANE) plasma. *Clin. Res.* 25, 520 A

Forbes, C.D., Pensky, J. & Ratnoff, O.D. (1970) Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thrombo-plastin antecedent by purified serum C1 inactivator. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 809 - 815

Frank, M.M., Gelfand, J.A. & Atkinson, J.P. (1976) Hereditary edema: the clinical syndrome and its management. *Ann. Intern. Med.* 84, 580 - 593

Fung, M.R., Hay, C.W. & MacGilliray, R.T. (1985) Characterization of an almost full-length cDNA coding for human blood coagulation factor X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3591 - 3595

Garoff, H. & Ansorge, W. (1981) Improvements in DNA sequencing gels. *Anal. Biochem.* 115, 450 - 457

Gitlin, D. & Biasucci, A. (1969) Development of G, A, M, B1C/B1A, C1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemo-pexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, α_1 - anti-trypsin, orosomucoid, β -lipoprotein, α_2 - macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. *J. Clin. Invest.* 48, 1433 - 1446

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557 - 580

Harpel, P.C. (1976) C1 inactivator. *Meth. Enzymol.* 45, 751 - 760

Harpel, P.C. & Cooper, N.R. (1975) Studies on human plasma C $\bar{1}$ -inactivator-enzyme interactions. 1. Mechanisms of interaction with C $\bar{1}$ s, plasmin and trypsin. J. Clin. Invest. 55, 593 - 604

Harpel, P.C., Lewin, M.F. & Kaplan, A.P. (1985) Distribution of plasma kallikrein between C $\bar{1}$ inactivator and α_2 -macroglobulin in plasma utilizing a new assay for α_2 -macroglobulin-kallikrein complexes. J. Biol. Chem. 260, 4257 - 4263

Harrison, R.A. (1983) Human C $\bar{1}$ inhibitor: improved isolation and preliminary structural characterization. Biochemistry 22, 5001 - 5007

Haupt, H., Heimbürger, N. Kranz, T. & Schwick, H.G. (1970) Ein Beitrag zur Isolierung und Charakterisierung des C $\bar{1}$ -Inaktivators aus Humanplasma. Eur. J. Biochem. 17, 254 - 261

Hock, H. (1987) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität München

Hsu, S. & Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 577 - 580

Huynh, T.H., Young, R.A. & Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: DNA cloning Volume I, a practical approach. (Glover, D.M., ed.), pp. 49 - 78, IRL Press, Oxford

Ikuta, T., Fujiyoshi, T., Kurachi, K. & Yoshida, A. (1985) Molecular cloning of a full-length cDNA for human alcohol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2703 - 2707

Kellermann, J., Lottspeich, F., Henschen, A. & Müller-Esterl, W. (1986) Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. Eur. J. Biochem. 154, 471 - 478

Kwok, S.C.M., Ledley, F.D., DiLella, A.G., Robson, K.J.H. & Woo, S.L.C. (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. Biochemistry 24, 556 - 561

Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105 - 132

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685

Laskowsky, M., Jr. & Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 593 - 626

Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Morton, D.B. (1977) The occurrence and function of proteolytic enzymes in the reproductive tract of mammals. In: *Proteinases of mammalian cell tissues* (Barrett, A.J., ed.), pp. 445 - 500, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam

Neurath, H. & Walsh, K.A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3825 - 3832

Nilson, T., Sjöholm, I. & Wiman, B. (1983) Structural and circular dichroism studies on the interaction between human C1-esterase inhibitor and C1s. *Biochem. J.* 213, 617 - 624

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361 - 363

Odermatt, E., Berger, H. & Sano, Y. (1981) Size and shape of human C1-Inhibitor. *FEBS Lett.* 131, 283 - 285

Ohkubo, I., Kurachi, K., Takasawa, T., Shiokawa, H. & Sasaki, M. (1984) Isolation of a human cDNA for α_2 -thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. *Biochemistry* 23, 5691 - 5697

Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1985) PIR Report REL-0185, Version 2.0, Natl. Biomed. Res. Found., Georgetown Univ. Med. Center, Washington, D.C.

Pixley, R.A., Schapira, M. & Colman, R.W. (1985) The regulation of human Factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. J. Biol. Chem. 260, 1723 - 1729

Prandini, M.-H., Reboul, A. & Colomb, M.G. (1986) Biosynthesis of complement C1 inhibitor by Hep G2 cells. Biochem. J. 237, 93 - 98

Proudfoot, N.J. & Brownlee, G.G. (1976) 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263, 211 - 214

Que, B.G. & Petra, P. H. (1986) Isolation and analysis of a cDNA coding for human C1 inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Comm. 137, 620 - 625

Ratnoff, O.D., Pensky, J., Ogsten, D. & Naff, G.B. (1969) The inhibition of plasmin, plasma kallikrein, plasma permeability factor, and the C1r subcomponent of the first component of complement by serum C1 esterase inhibitor. J. Exp. Med. 129, 315 - 331

Reich, E., Rifkin, D. & Shaw, E. (1975) Limited proteolysis and biological control (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY)

Reid, K.B.M. & Porter, R.R. (1981) The proteolytic activation systems of complement. Ann. Rev. Biochem. 50, 433 - 464

Rosen, F.S., Charache, P., Pensky, J. & Donaldson, V. (1965) Hereditary angioneurotic edema: two genetic variants. Science 148, 957 - 958

Rosen, F.S., Alper, C.A., Pensky, J., Klemperer, M.R. & Donaldson, V.H. (1971) Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. J. Clin. Invest. 50, 2143 - 2149

Salvesen, G.S., Catanese, J.J., Kress, L.F. & Travis, J. (1985) Primary structure of the reactive site of human C1-Inhibitor. J. Biol. Chem. 260, 2432 - 2436

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467

Schapira, M., Scott, C.F. & Colman, R.W. (1982) Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. *J. Clin. Invest.* 69, 462 - 468

Schapira, M., Silver, L.D., Scott, C.F., Schmaier, A.H., Prograis, L.J., Curd, J.G. & Colman, R.W. (1983) Prekallikrein activation and high-molecular-weight kininogen consumption in hereditary angioedema. *N. Engl. J. Med.* 308, 1050 - 1053

Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the active site of proteases. 1. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157 - 162

Sim, R.B., Reboul, A., Arlaud, G.J., Villiers, C.L. & Colomb, M.G. (1979) Interaction of ^{125}I -labelled complement subcomponents C1r and C1s with proteinase inhibitors in plasma. *FEBS Lett.* 97, 111 - 115

Strauss, E.C., Kobori, J.A., Siu, G. & Hood, L. (1986) Specific-primer-directed DNA sequencing. *Anal. Biochem.* 154, 353 - 360

Takagaki, Y., Kitamura, N. & Nakanishi, S. (1985) Cloning and sequence of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. *J. Biol. Chem.* 260, 8601 - 8609

Tosi, M., Duponchel, C., Bourgarel, P., Colomb, M. & Meo, T. (1986) Molecular cloning of human C1 inhibitor: sequence homologies with α_1 -antitrypsin and other members of the serpins superfamily. *Gene* 42, 265 - 272

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350 - 4354

Travis, J. & Salvesen, G.S. (1982) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 655 - 709

van der Graaf, F., Koedam, J.A., Griffin, J.H. & Bouma, B.N. (1983) The interaction of human plasma kallikrein and its light chain with C1 -inhibitor. *Biochemistry* 22, 4860 - 4866

von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage site. *Nucl. Acids Res.* 14, 4683 - 4690

Weaver, C.A., Gordon, D.F. & Kemper, B. (1981) Introduction by molecular cloning of artifactual inverted sequences at the 5' terminus of the sense strand of bovine parathroid hormone cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4073 - 4077

Weiss, V. & Engel, J. (1983) Heparin-stimulated modification of C $\bar{1}$ -inhibitor by subcomponent C $\bar{1}$ s of human complement. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 295 - 301

Wiman, B. & Collen, D. (1978) Molecular mechanisms of physiological fibrinolysis. Nature 272, 549 - 550

Young, R.A. & Davis, R.W. (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1194 - 1198

G. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAP	Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex
Bp	Basenpaare
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FPLC	fast protein liquid chromatography
HMW	high molecular weight
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
kBp	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
LMW	low molecular weight
M _r	relative Molekularmasse (= Molekulargewicht)
pfu	plaque forming units
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natrium-Dodecylsulfat)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
ddATP	2', 3'-Didesoxyadenosin 5'-Triphosphat
ddCTP	2', 3'-Didesoxycytidin 5'-Triphosphat
ddGTP	2', 3'-Didesoxyguanosin 5'-Triphosphat
ddTTP	2', 3'-Didesoxythymidin 5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ddNTP	2', 3'-Didesoxynukleosid 5'-Triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)

LEBENS LAUF

Name:	Günther Rauth
Geburtsdatum:	4.9.1954
Geburtsort:	Feuchtwangen
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Stefan Rauth Maria Pauline Rauth, geb. Rauth
1961 - 1965	Volksschule Büchenbach
1965 - 1974	Adam-Kraft-Gymnasium Schwabach
Juni 1974	Abitur
1974 - 1976	Wehrdienst in Landsberg/Lech
1976 - 1978	Studium der Chemie an der Universität Regensburg
1978 - 1981	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Juli 1981	Diplom-Hauptprüfung
Oktober 1981 - September 1982	Diplomarbeit "Menschliches niedermolekulares Kininogen: Isolierung, Fragmentierung und Gewinnung spezifischer Antikörper" Abteilung für Klin. Chemie und Klin. Biochem. in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz)
Januar 1983 - Oktober 1986	Anfertigung der vorliegenden Arbeit in der Abteilung für Klin. Chem. und Klin. Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. H. Fritz)

